FEINNADELASPIRATIONSZYTOLOGIE DER MILZ BEI TUMORWACHSTUM UND CYCLOPHOSPHAMIDTHERAPIE BEI MÄUSEN

MARTIN REUTER

1988

Disbui. München

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554823_0089

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
der Universität München
Vorstand : Prof. Dr.Dr.h.c. W.Brendel

FEINNADELASPIRATIONSZYTOLOGIE DER MILZ BEI TUMORWACHSTUM UND CYCLOPHOSPHAMIDTHERAPIE BEI MÄUSEN

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Martin Reuter
aus
Ulm
Jahr
1988

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der „Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr.Dr. C.Hammer
1.Mitberichterstatter:	Prof. Dr.Dr.h.c. W.Brendel
2.Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H.Eder
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. C.Lersch
Dekan:	Prof. Dr. W.Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	14.4.1988

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A.Einleitung	1
B.Fragestellung	3
C.Material und Methoden	4
1.Allgemeines	4
1.1.Cyclophosphamid	4
1.2.Versuchstiere	6
1.3.Tumor (Lewis-Lung-Tumor)	6
2.Versuch I: Feinnadelaspirationsbiopsie der Milz	7
2.1.Versuchsaufbau	7
2.2.Verlagerung der Milz, Messung des Milzoberflächenprodukts	8
2.3.Technik der Feinnadelbiopsie	9
2.4.Feinnadelaspirationszytologie	9
2.4.1.Zählung der Zellen	9
2.4.2.Lichtmikroskopische Differenzierung der Milzzellen	10
2.4.3.Immunfluoreszenzmikroskopische Differenzierung der Milzzellen	10
2.4.4.Phagozytosetest	11
2.4.5.Umrechnung auf absolute Zahlen	13
2.5.Blutentnahme	14
3.Versuch II: Splenektomie	14
4.Versuch III: Winn Assay	16
4.1.Allgemeines	16
4.2.Spezieller Aufbau	17

5.Statistik 18

D.Ergebnisse 19

1.Versuch I: Feinnadelaspirationsbiopsie 19
1.1.Tumorwachstum 19
1.2.Gesamtzellen und Lymphozyten 21
1.3.Lymphozytensubpopulationen 24
1.4.Granulozytensubpopulationen 27
1.5.Phagozytosetest 30
1.6.Peripheres Blut 33

2.Versuch II: Splenektomie 36
2.1.Tumorwachstum 36
2.2.Überlebenszeit 37

3.Versuch III: Winn Assay 38

E.Diskussion 40

1.Tumorwachstum 40
1.1.Kontrollgruppe 41
1.2.Immunmodulatorische Gruppe 42
1.2.Zytostasegruppe 45

2.Zelluläre Veränderungen in der Milz 47
2.1.Kontrollgruppe 47
2.2.Immunmodulatorische Gruppe 50
2.3.Zytostasegruppe 52

3.Phagozytoseleistung der Milz 56
3.1.Kontrollgruppe 56
3.2.Immunmodulatorische Gruppe 58
3.3.Zytostasegruppe 58

4.Zelluläre Veränderungen im peripheren Blut 59
4.1.Kontrollgruppe 59
4.2.Immunmodulatorische Gruppe 60
4.3.Zytostasegruppe 61

5.Der Einfluß der Milz auf das Tumorwachstum 63

6.Wirkungen von Cyclophosphamid auf die Zellpopulationen und deren Funktionen 66
6.1.B-Zellen 66
6.2.Helferzellen 68
6.3.Effektorzellen 69
6.4.Suppressorzellen 70

7.Möglichkeiten der Wechselwirkungen von Cyclophosphamid mit dem Tumornekrosefaktor (TNF) 75

8.Klinischer Ausblick 76

F.Zusammenfassung 78

G.Bisher veröffentlichte Teilaspekte dieser Arbeit 80

H.Literaturnachweis 81

Anhang

Abkürzungen

ADCC	Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity
b	Breite der Milz
B	Breite des Tumors
BCG	Bacillus-Calmette-Guerin
ca.	cirka
°C	Grad Celsius
CFU	Colony-forming-unit
cm^2	Quadratzentimeter
ConA	Concanavalin A
CSF	Colony-stimulating-factor
Cy	Cyclophosphamid
DNP	Dinitrophenol
DNP-KLH	Dinitrophenol-keyelimpethemocyanin
DTH	Delayed-type-hypersensitivity
FNA	Feinnadelaspiration
g	Gewicht des Punktats
G	Berechnetes Gewicht der Milz
HBSS	Hanks buffered salt solution
i.p.	intraperitoneal
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Länge der Milz
L	Länge des Tumors
LL	Lewis Lung
3LL	3 Lewis Lung
LPS	Lipopolysaccharid
m^2	Quadratmeter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
µM	mikromolar
n	Anzahl der Zellen im Punktat
N	Anzahl der Zellen in der Milz
NK-Zellen	Natural-killer-Zellen
nmol	Nanomol
p	Signifikanzniveau
PGE2	Prostaglandin E2
PHA	Phytohämagglutinin
RPMI	Roswel-Park-Memorial-Institute-Lösung
s.c.	subcutan
ShOp	Scheinoperation
Sx	Splenektomie
TNF	Tumornekrosefaktor
Tu.Inok.	Tumorinokulation
Upm	Umdrehungen pro Minute
WBZ	weiße Blutzellen
4-OH-Cy	4-Hydroxy-Cyclophosphamid
♀	weiblich

A.Einleitung

Die Milz - Galenos von Pergamon (129-201 n.Chr.) nannte sie ein "Organon plenum mysterii" (198) - blieb lange Zeit unbeachtet, ihre Funktion und Bedeutung wurden nicht erkannt.
Galen, dessen Einfluß bis in die Neuzeit reichte, vermutete in ihr den Ursprung der schwarzen Galle und den Abbauort von Blutbestandteilen (198). Bis in das 20. Jahrhundert galt dieses Organ als entbehrlich.
Heute schreibt man der Milz, als einem Teil des retikuloendothelialen Systems, mehrere Schlüsselfunktionen zu.
Einerseits übt die Milz eine Filterfunktion aus, indem sie Fremdpartikel, Bakterien und überalterte Blutzellen eliminiert (166, 202). Andererseits spielt die Milz eine wichtige Rolle bei der zellulären und humoralen Immunantwort auf Antigenstimulation. Sie soll auch ein Entstehungsort für Lymphozyten und Monozyten sein (166, 202, 216).
Anfang dieses Jahrhunderts beschrieb Brüda als erster den Einfluß der Milz auf das Tumorwachstum (29). In späteren Arbeiten wurde sowohl ein blastomhemmender (70, 87) wie -fördernder Effekt (36, 60) dokumentiert.
Aufgrund dieser kontroversen Befunde ist die Frage der Splenektomie nach wie vor aktuell. Beim Magenkarzinom des Menschen scheint sie, v.a. was die Überlebenszeit betrifft, einen positiven Effekt zu besitzen (188), dieser wird jedoch z.T. mit dem Risiko eines Postsplenektomiesyndroms erkauft (42, 44, 124, 126).
Im Tierversuch war eine signifikante Überlebenszeitverlängerung nur dann zu erzielen, wenn die Milz an den Tagen 0-3 nach Tumorinokulation entfernt wurde (117, 121, 212). Zu einem späteren Zeitpunkt blieb der Erfolg dieses Eingriffs aus. Deshalb wurde angenommen, daß es auf den funktionellen Zustand der Milz ankam, ob eine Splenektomie Vor- oder Nachteile brachte.
Da die Splenektomie eine einmalige Maßnahme darstellt,

wurde schon früher versucht, die Milz zu bestrahlen, um möglichst selektiv Milzzellpopulationen zu zerstören (57). Vor allem Zellen, die das Tumorwachstum fördern und damit die Überlebenszeit verkürzen, sollten getroffen werden. Der Nachteil dieser Methode lag im beträchtlichen apparativen Aufwand und in den Nebenwirkungen ionisierender Strahlen begründet.

Deshalb wurde nach neuen Wegen gesucht, um dies zu verwirklichen. Es scheint, als ob die Chemotherapie eine schonendere und klinisch leichter durchführbare Methode darstellt. Ein selektiver Einfluß auf bestimmte Milzzellsubpopulationen wurde in den letzten Jahren für das Cyclophosphamid beschrieben.

Ziel dieser Studie war es, eine Immunmodulation mit einer nicht zytotoxischen Dosis zu erreichen, durch die das Tumorwachstum gebremst wird, ohne große nachteilige Nebenwirkungen zu erzeugen.

B.Fragestellung

Diese Untersuchungen sollten Antwort auf folgende Fragen geben:

1. Ist durch Cyclophosphamid in einer nicht zytostatischen Dosis eine Immunmodulation möglich?

2. Welchen Einfluß hat Cyclophosphamid auf die Milzzellpopulationen?

3. Kommt es dabei zu einem Wachstumsstillstand bzw. zu einer Regression des Tumors?

4. Hängt dieser Effekt von der Milz ab?

5. Läßt sich dieser Effekt in einem Winn Assay bestätigen?

C.Material und Methoden

1.Allgemeines

1.1.Cyclophosphamid

Cyclophosphamid[1] ist ein 2-(Bis-(2-chloräthyl)-amino) tetra hydro-2H-1,3,2-oxaphosphorin-2-oxid (4).

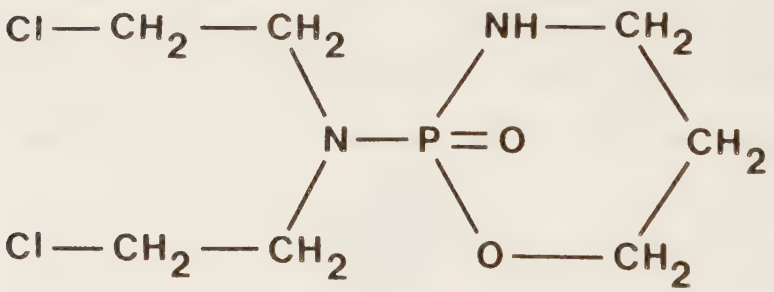


Abb.1: Strukturformel von Cyclophosphamid

Cyclophosphamid wurde 1958 entdeckt. Es gehört zu den alkylierenden Substanzen. Unter Abspaltung eines Nucleophils, in diesem Falle ist es Chlorid (Cl), geht es eine kovalente Bindung über eine Alkylgruppe ein. Die allgemeine Alkylierungsreaktion lautet:

$$R\text{--}CH_2\text{--}Y + X \longrightarrow R\text{--}CH_2\text{--}X + Y$$

---

1) : Endoxan, ASTA Werke, Bielefeld

In unserem Fall entspricht Y dem Chlorid.
Cyclophosphamid ist in seiner oben gezeigten Formel in vitro eine inaktive Substanz (4, 88). Dies liegt an der sterischen Hemmung der beiden Alkylketten durch den angehängten heterogenen 6-Ring. Erst durch eine Hydroxilierung in Stellung 4 zum 4-OH-Cyclophosphamid, die nur in der Leber durch mischfunktionelle Hydrolasen bzw. das Cytochrom P 450 System geschieht, wird das Cyclophosphamid eine, auch in vitro, aktive Substanz. Das 4-OH-Cyclophosphamid steht im Gleichgewicht mit seinem Tautomer Aldophosphamid, das unter enzymatischer Abspaltung der hochgiftigen Substanz Akrolein zum N-Lost-Phosphorsäure-Diamid wird. Letzteres und ein weiteres Abbauprodukt, das Nornitrogen-Mustard, sind zur eigentlichen "Alkylierungsreaktion" fähig. Dabei kommt es durch eine innermolekulare nucleophile Substitution zur Abspaltung von Cl, das zentrale Stickstoffatom, das jetzt eine positive Ladung trägt, reagiert mit den beiden C-Atomen einer Kette zu einem sehr instabilen heterogenen 3-Ring weiter. Dieser zerfällt unter Anlagerung eines Nucleophils wieder zur C-Kette. Als Beispiele für eine solche Gruppe seien stellvertretend nur H_2O, OH^-, R-COOH, R-O-R, R-NH_2, R-S-R und R-OH genannt.
Angriffspunkt für das Cyclophosphamid sind damit nicht nur Nukleotide, sondern im Prinzip alle Moleküle, die derartige Gruppen tragen, also auch Enzyme, Membranbestandteile usw. (4, 88).
Eine andere Möglichkeit der Reaktion besteht nach der Thiol-Bindungs-Hypothese (4).
Nach Aktivierung zu 4-OH-Cyclophosphamid wird dieses durch eine stabile Sulfidbindung im Gewebe deaktiviert und festgehalten. Die DNS Polymerase assoziierte -3'-5' Exonuklease spaltet davon jedoch Phosphorsäure-Diamid ab, das wiederum den DNS Polymerase-Teil des Holoenzyms alkyliert. Auf diesem Weg soll es die Zellproliferation hemmen.
Cyclophosphamid wirkt vor allem in der G2- bzw. S-Phase des Zellzyklus.
Hauptnebenwirkung dieser Substanz ist neben Nausea, Übelkeit, Erbrechen und Haarausfall die hämorrhagische Zystitis

(4).
Cyclophosphamid liegt in Fläschchen zu 100 mg kristallin vor. Nach Auflösung in 10 ml isotonischer Kochsalzlösung wurde es für diese Versuche noch weiter verdünnt, bis die gewünschte Menge an Cyclophosphamid genau in 0,5 ml enthalten war. Es wurde dem Versuchstier intraperitoneal (i.p.) appliziert.

1.2.Versuchstiere

Versuchstiere waren ausgezüchtete weibliche NMRI Mäuse[1], die zu Versuchsbeginn 3-4 Monate alt waren. Jeweils 5 Tiere wurden in Makrolankäfigen Typ II gehalten. Sie erhielten Wasser und Pellets ad libitum. Die Raumtemperatur war 22°C, die Luftfeuchtigkeit betrug 65%. Eine Gewichtskontrolle erfolgte alle 10 Tage.

1.3.Tumor (Lewis Lung Karzinom)

Das in über 200 Tierpassagen von der C 57 bl auf die NMRI Maus adaptierte 3 Lewis Lung Karcinom (208) wurde als Tiermodell gewählt.
Die Herstellung der Tumorzellsuspension erfolgte nach Euthanasie der Spendertiere durch Äther und Entnahme des vitalen Tumorgewebes unter sterilen Kautelen. Nach dem Zerreiben über einem feinmaschigen Sieb und dem anschließenden Passieren durch eine sterile Kompresse mit Hilfe isotonischer Kochsalzlösung wurde die Zellzahl in einem automatischen Zähler[2] bestimmt.
Die Resuspension erfolgte in Roswel-Park-Memorial-Institute-(RPMI)-Lösung[3] mit 5% Fetal-Calf-Serum (FCS)[3].

---

1) : Tierversuchsanstalt Oberschleißheim
2) : Clay Adams Hematology Analyzer S, Becton Dickinson, New Yersey 07054, USA
3) : Klinikapotheke

Diese Zellsuspension wurde abzentrifugiert (30% = 1800 Upm)[1] und mit $5,0x10^7$ Zellen in 0,5ml je Maus subcutan injiziert. Die Vitalität der Tumorzellen, bestimmt durch die Trypanblau-methode, betrug dabei zwischen 23 und 42%. Das Wachstum wurde durch Messung des größten und kleinsten Durchmessers des entstandenen Tumors an der Grundfläche (LxB) mit einer Schublehre bestimmt.

2.Versuch I: Feinnadelaspirationsbiopsie (FNAB) der Milz

2.1.Versuchsaufbau

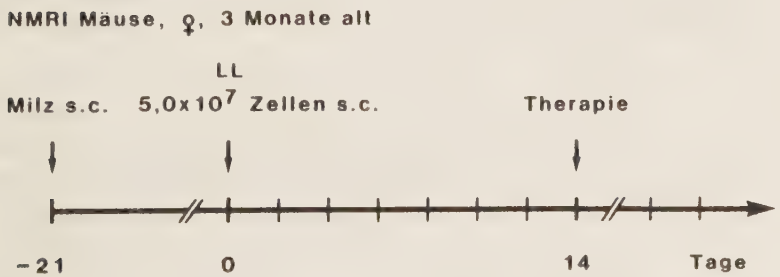


Abb.2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

Bei jeweils 10 Tieren wurden 3 Wochen vor Versuchsbeginn die Milzen subcutan verlagert und fixiert. Nach vollständiger Abheilung der Wunden wurden die verlagerten Milzen an den Tagen -4, -2 und 0 biopsiert, um den Ausgangswert festzulegen. Danach wurde jeden zweiten Tag bis zum Abbruch des Versuchs oder bis zum Tod der Tiere durch FNAB Material entnommen. Am Tag 0 erhielten die Tiere $5x10^7$ Tumor-

---

1) : Rotanta/K, Fa. Hettich, 7200 Tuttlingen

zellen subcutan injiziert, am Tag 14 setzte die Therapie ein. Die Tiere wurden in 3 Gruppen zur Prüfung der Cyclophosphamidwirkung randomisiert:

a)Kontrollgruppe: 0,5 ml isotonische Kochsalzlösung

b)Immunmodulatorische Gruppe: 10 mg/kgKG Cyclophosphamid

c)Zytostasegruppe: 250 mg/kgKG Cyclophosphamid

Weitere Versuche wurden durchgeführt, sie sollen hier aber der Übersichtlichkeit wegen nicht ausführlich dargestellt werden.

Unter Tumorwachstum erwiesen sich 5 mg/kg Cyclophosphamid als eine nicht wirksame Dosis, 20 mg/kg Cyclophosphamid zeitigten die gleichen Auswirkungen wie 10 mg/kg.

Außerdem wurden Versuche mit Cyclophosphamid in Dosierungen von 5, 10, 20 und 250 mg/kg ohne Tumorwachstum unternommen.

2.2.Verlagerung der Milz und Messung des Milzoberflächenprodukts

Unter Äthernarkose wurden die Tiere subcostal laparotomiert, die Milz mobilisiert und gestielt durch die Muskellücke extrathorakal gelagert. Die Lücke wurde mittels einer Tabaksbeutelnaht[1)] verschlossen. Der intakte venöse Abfluß wurde durch eine kleine Injektion von 5% isotoner Trypanblaulösung kontrolliert. Bei bestehendem venösen Abfluß wurde der Farbstoff binnen weniger Sekunden aus der Milz eliminiert. Der Verschluß der Wunde erfolgte mit drei Einzelknopfnähten[1)], nachdem vorher eine kleine Hauttasche zur Aufnahme des Organs geschaffen wurde. Die Milz war nach dieser Operation gut sichtbar und tastbar unter dem Fell und konnte mit einer Schublehre genau vermessen werden. Das Produkt aus jeweils der größten Länge und Breite ergab das Oberflächenprodukt (bxl).

---

1) : Prolene 3,0, Ethicon GmbH, 2000 Norderstedt

2.3.Technik der Feinnadelbiopsie

In eine 2 ml Plastikspritze[1)] wurden 0,5 ml heparinhaltige "Hanks Buffered Salt Solution" (HBSS)[2)] aufgezogen.Nach vollständiger Entlüftung der Spritze wurde eine Spinalkanüle[3)] aufgesetzt und das gesamte System auf einer Präzisionswaage[4)] gewogen.
Die eigentliche Punktion erfolgte nach Äthernarkose und Desinfektion mit Kodanlösung tangential zur Milzoberfläche, wobei die Nadel etwa 1 cm caudal des transferierten Organs durch das Fell gestochen und subcutan vorgeschoben wurde. Dies hatte gegenüber der direkten transkutanen Punktion den Vorteil, daß keine Infektionen auftraten. Durch dreimaliges kurzes Vor- und Zurückschieben der Nadel unter gleichzeitigem Sog konnte genügend Material entnommen werden. Nach der Punktion wurde das System erneut gewogen. Die Differenz der Wägungen vorher und nachher ergab das Gewicht des Punktats. Ein dreimaliges Durchspülen von Spritze und Kanüle zur Ausschwemmung aller Zellen beendete diesen Arbeitsschritt.

2.4.Feinnadelaspirationszytologie

2.4.1.Zählung

Die aspirierten weißen und roten Zellen des Punktats wurden in einem automatischen Zellzählgerät[5)] gezählt.

---

1) : 2 ml, Luer, Braun Melsungen
2) : Tris-Hank'sche Lösung, pH 7,4, ohne Phenolrot, Klinikapotheke
3) : Spinal Needle B-D, 9/-7, 226, 3 1/2, Braun Melsungen
4) : Mettler H51 AR, Mettler GmbH, Giessen
5) : Clay Adams Hematology Analyzer S, Becton Dickinson, New Yersey 07054, USA

2.4.2.Lichtmikroskopische Differenzierung

Nach der Zählung wurden etwa 200 000 Zellen aus der Suspension in die Küvette einer Zytozentrifuge[1] pipettiert und mit 100 µl HBSS gemischt. Die Laufzeit der Maschine betrug 5 min bei 500 Upm entsprechend 30 G. Nach einer Stunde Lufttrocknung und Färbung nach Pappenheim (14) konnten unter einem Universalmikroskop[2] bei 800-facher Vergrößerung die Präparate differenziert werden. Folgende Zellreihen wurden unterschieden (83):

Lymphatische Reihe : Alle reifen und unreifen Lymphozyten wurden unter dem Begriff Lymphozyten subsummiert.

Granulozyten : Proliferationspool: - Myeloblast - Promyelozyt - Myelozyt
Reifungspool: - Juvenile - Stabkernige - Segmentkernige
Die Zellen vom Myeloblasten bis zum Juvenilen wurden als unreife Zellen gezählt, der Rest als reife.

Erythropoetische Zellen: Alle Zellformen der Erythropoese wurden zusammengezählt.

2.4.3.Immunfluoreszenzmikroskopische Differenzierung

Folgende fluoreszeingekoppelte Antikörper wurden zur Differenzierung verwendet:

- Anti Thy 1.2[3] : Richtet sich gegen ein Oberflächenantigen, das thymusabhängige T-Zellen charakterisiert (172)

---

1) : Cytospin II, Shandon, Labortechnik GmbH, Frankfurt

2) : Zeiss Mikroskop, Standard, Oberkochen

3) : Cedarlane Laboratories Ltd., Hornby, Ontario, Canada

- Anti Lyt 2.1[1] : Markiert Oberflächenantigene der zytotoxischen T-Zellen und Suppressorzellen (32, 197)
- Anti IgG[2] : Richtet sich gegen Zellen, die IgG tragen

$1x10^6$ Zellen des Milzpunktates wurden mit 10 µl der 1:10 verdünnten Antikörpersuspension bei konstantem Volumen von 250 µl gemischt und 60 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen. Durch hypotonen Schock mit Aqua dest. wurden die Erythrozyten zerstört. Zweihundert Zellen der weißen Reihe wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop[3] im Dunkelfeld gezählt. Die erhaltenen Prozentwerte an fluoreszierenden Zellen wurden auf Absolutwerte umgerechnet (s.u.).

2.4.4.Phagozytosetest

Die Tumorabwehr wird noch in eine spezifische und eine unspezifische Funktion gegliedert. Die spezifische wird v.a. durch Lymphozyten repräsentiert, während die unspezifische besonders auf der Funktion von Phagozyten beruht. Deren Aktivität sollte durch die Phagozytose opsonierter Partikel erfaßt werden. Der Phagozytoseassay wurde folgendermaßen durchgeführt:

- Cymosan[4] : Als Substrat für die Granulozyten diente Cymosan, ein Bestandteil der Zellwand von Hefezellen. Cymosan wurde in einem Mörser in Partikel zwischen 3 und 6 µm Durchmesser zerkleinert. 25 mg davon wurden in 10 ml isotoner Kochsalzlösung suspendiert und 30 min bei 90°C im Wasserbad erhitzt.

---

1) : Cedarlane Laboratories Ltd., Hornby, Ontario, Canada
2) : Tago Inc., Burlingame, California
3) : Großes Forschungsmikroskop, Kurzpaßfilter Kp 500, Anregungsfilter 200, Zeiss, Oberkochen
4) : Cymosan, Best.Nr. 4250, Sigma

- Opsonierung: Nach Abkühlung wurden diese 10 ml Suspension mit der gleichen Menge frischen Mäuseserums vermischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (200 G, 10 min) wurde der Überstand abgegossen, der Niederschlag mit 50 ml isotoner Kochsalzlösung gemischt und erneut zentrifugiert. Der letzte Niederschlag wurde in 10 ml isotoner Kochsalzlösung aufgenommen und bis zur Verwendung in 1 ml Aliquots in Plastikgefäßen eingefroren (23). Eine Stunde vor Gebrauch wurde die Suspension aufgetaut und 15 min auf einem elektrischen Rüttler gleichmäßig resuspendiert.
- Phagozytoseassay: $2x10^6$ Zellen aus dem Milzpunktat wurden mit HBSS gewaschen und in einem Reagenzglas mit 50 µl der oben beschriebenen Cymosansuspension vermischt. Das Volumen wurde mit HBSS auf 0,5 ml aufgefüllt. Wie sich in Vorversuchen zeigte, reichte eine Stunde Inkubation für die Phagozytose aus. Danach wurden die Zellen schonend abzentrifugiert (200 G, 5 min), gewaschen und mittels einer Zytozentrifuge auf Objektträger gebracht (s.o.). Einstündige Lufttrocknung und Färbung nach Pappenheim beendeten diesen Vorgang.
- Auswertung: Die Auszählung der phagozytierenden Zellen erfolgte unter dem Lichtmikroskop[1)] bei 800-facher Vergrößerung.

Als phagozytiert wurde eine Partikel nur gewertet, wenn gleichzeitig

- die Zelle intakt war
- der Zellkern eindeutig zu identifizieren war
- die Partikel vollständig innerhalb der Zellgrenzen lag
- eindeutig eine Membran um die Partikel zu erkennen war

Es spielte dabei keine Rolle, ob ein Phagozyt eine oder mehrere Partikel inkorporiert hatte.

Die Anzahl der
phagozytierenden Zellen/100 reife Granulozyten x 100 (%)

---

1) : Zeiss Mikroskop, Standard, Oberkochen

wurde bestimmt.
Die erhaltenen Prozentwerte wurden auf Absolutwerte umgerechnet.

2.4.5.Umrechnung auf absolute Zahlen

Splenogramme sind aussagekräftiger, wenn statt der relativen absolute Zellzahlen berechnet werden. Zu- oder Abnahme der Gesamtmilzzellen werden hier im Gegensatz zu den relativen Werten miterfaßt. Zellwanderungen lassen sich damit nachweisen.

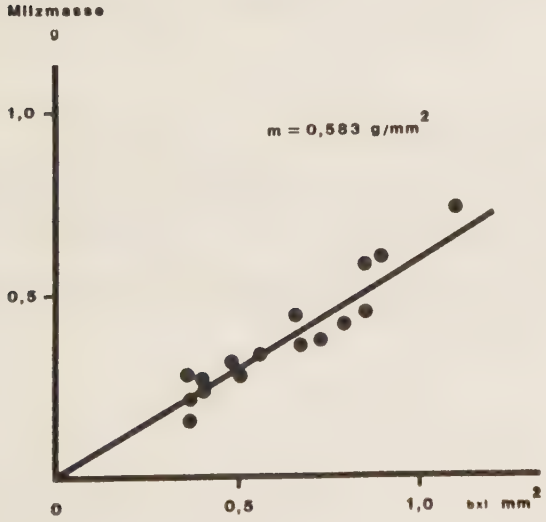


Abb.3: Zusammenhang zwischen Milzmasse und Oberflächenprodukt der Milz (lxb) bei NMRI-Mäusen (n=16)

Zu diesem Zweck wurde 16 Mäusen zunächst die Milz subcutan verlagert, vermessen, anschließend entfernt und gewogen. Abb. 3 zeigt den daraus gewonnenen Zusammenhang zwischen Milzgewicht und -größe. Der Umrechnungskoeffizient beträgt 0,583 g/cm^2.

Aus den gemessenen Werten

lxb (Länge x Breite der Milz)

g (Gewicht des Punktats)

n (Anzahl der Zellen im Punktat)

und des bestimmten Wertes G (Milzgewicht, siehe Diagramm) ergibt sich für die absolute Anzahl der Zellen in der Milz (N) die Beziehung:

$N = G \times n / g$

Mit dieser Formel läßt sich die Gesamtzahl der in der Milz befindlichen Zellen errechnen. Die oben ermittelten %-Werte können hiermit in Absolutwerte umgeformt werden.

2.5.Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte aus der ventralen Schwanzvene, nachdem die Schwänze der Mäuse vorher mit Rotlicht erwärmt wurden.

15 µl Blut reichten für einen Ausstrich. Nach Lufttrocknung wurde er nach Pappenheim gefärbt.

3.Versuch II: Splenektomie

Um den rein zytostatischen Effekt von Cyclophosphamid auf die Tumorzellen von dem immunmodulatorischen durch die Milzzellen abzugrenzen, wurden bei 4 Gruppen mit je 10 weiblichen NMRI Mäusen Lewis Lung Tumoren gesetzt. 14 Tage später erhielten die Tiere der Gruppen 1 und 2 jeweils 0,5 ml isotone Kochsalzlösung i.p., die der Gruppen 3 und 4 je 10 mg/kgKG Cyclophosphamid in 0,5 ml isotoner Kochsalzlösung. Um zu prüfen, ob die Wirkung tatsächlich über die Modifikation der Immunantwort von Milzzellen auf den Tumor

wirkt, wurden die Tiere der Gruppen 2 und 4 zusätzlich splenektomiert. Die Tumoren wurden, wie unter 1.3. beschrieben, vermessen und die Überlebenszeiten registriert.
Das folgende Schema zeigt den Ansatz:

		Tag 0	Tag 14
Gruppe 1:	10 NMRI-Mäuse	LL-Tumor	NaCl + ShOp
Gruppe 2:	10 NMRI-Mäuse	LL-Tumor	NaCl + Sx
Gruppe 3:	10 NMRI-Mäuse	LL-Tumor	Cy + ShOp
Gruppe 4:	10 NMRI-Mäuse	LL-Tumor	Cy + Sx

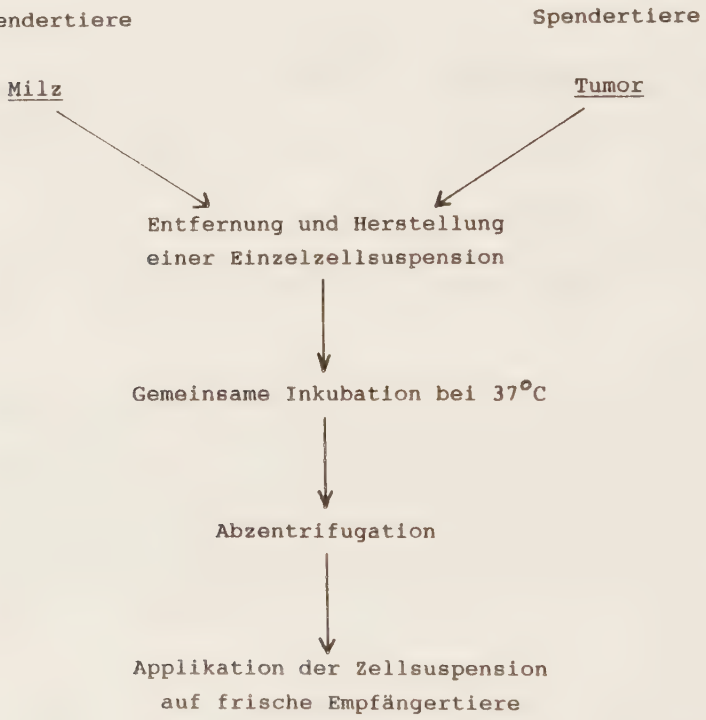
ShOp: Scheinoperation, bedeutet Eröffnung von Fell und Peritoneum bis zur Darstellung der Milz, anschließend Verschluß von beidem mit 3 Einzelknopfnähten

Sx : Splenektomie; Eröffnung des Abdomens, der Gefäßstiel der Milz wurde unter Zuhilfenahme einer elektrischen Dipolpinzette zur Blutstillung gekautert, die Milz wurde entfernt, Wundverschluß wie oben

4.Versuch III : Winn Assay

4.1.Allgemeines

Folgendes Schema veranschaulicht das Prinzip eines Winn Assays:



Milz- und Tumorzellen in Einzelzellsuspension werden im Verhältnis 10 : 1 im Reagenzglas inkubiert. Eine Stunde später wird diese Suspension in eine dritte Maus gespritzt. Befinden sich unter den Milzzellen solche, die für Tumorzellen zytotoxisch sind, so werden sie diese während der Inkubation abtöten. Auf einem frischen Empfängertier entsteht eine verringerte Tumoranwachsrate oder ein vermindertes Tumorwachstum im Vergleich zur unbeeinflußten

Tumorprogression. Sind in der Gesamtsuspension keine zytotoxischen Zellen, so unterscheidet sich das Tumorwachstum nicht gegenüber der Kontrollgruppe. Tumorfördernde Milzzellen verstärken das Tumorwachstum (231).

4.2.Spezieller Versuchsansatz

Folgende Tabelle verdeutlicht den genauen Versuchsansatz:

	Tumorzellen	Milzzellen	
Gruppe I	$5x10^7$	keine	
Gruppe II	$5x10^7$	$5x10^8$	von 16 Tage tumortragenden Mäusen
Gruppe III	$5x10^7$	$5x10^8$	von gesunden Mäusen
Gruppe IV	$5x10^7$	$5x10^8$	von Mäusen nach 14 Tagen Tumorwachstum plus 2 Tage nach Cyclophosphamidtherapie (10mg/kg)

Weibliche NMRI Mäuse wurden in 4 Gruppen von je 10 Tieren randomisiert.
Die Tumorzellen stammten aus 20 Mäusen, welche den Tumor genau 14 Tage trugen.
Gruppe I erhielt als Kontrolle nur Tumorzellen.
Gruppe II bekam Tumorzellen vermischt mit Milzzellen von 14 Mäusen, die den Tumor 16 Tage lang trugen.
Gruppe III, als weitere Kontrolle, erhielt neben Tumorzellen Milzzellen von 14 gesunden Mäusen.
Gruppe IV, die eigentliche Prüfgruppe, erhielt neben Tumorzellen auch Milzzellen von 14 Mäusen, die nach 14 Tagen Tumorwachstum 10 mg/kg Cyclophosphamid i.p. bekamen. Die Milzen verblieben noch 2 Tage im Tier, um das Cyclophosphamid wirken zu lassen.

Die Organe wurden zur Erhaltung einer Einzelzellsuspension zunächst mehrfach durch ein feines Drahtsieb gepreßt und anschließend durch sterile Kompressen gefiltert. Die Kontrolle der Einzelzellsuspension erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Einmaliges Waschen mit HBSS vervollständigte den Arbeitsgang.
Danach wurde der eigentliche Winn Assay angesetzt:
Die Tumorzellen wurden mit den Milzzellen im Wärmeschrank bei 37°C eine Stunde lang in einer RPMI-Lösung inkubiert. Die Zellen der Gruppe 1 befanden sich nur in RPMI-Lösung.
Anschließend wurden die Suspensionen abzentrifugiert, sodaß ein Volumen von 1 ml/Maus übrig blieb. Dies wurde subcutan gespritzt.
Die Tumorangehrate, das Tumorwachstum (BxL) und die Überlebenszeit wurden registriert.

5.Statistik

Von den erhaltenen Werten wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem David Quotienten. Signifikanzen wurden mit dem Wilcoxon Test bestimmt (183).
In Versuch I erfolgte diese Prüfung nur zwischen den Tagen 14, unmittelbar vor, und Tag 16, 2 Tage nach Therapie.
In Versuch II interessierten die verschiedenen Überlebenszeiten.
Signifikanzen wurden mit dem gleichen Symbol gekennzeichnet, das Signifikanzniveau mit mindestens 0,05 festgelegt.

D.Ergebnisse

1.Versuch I: Feinnadelaspirationsbiopsie

Die Feinnadelaspirationsbiopsie wurde in drei Versuchstiergruppen durchgeführt:
a)Unbehandelte Kontrolltiere mit Tumoren
b)Tiere mit Tumoren und 10 mg/kg Cyclophosphamid
c)Tiere mit Tumoren und 250 mg/kg Cyclophosphamid

1.1.Tumorwachstum

Die Tumorwachstumskurve der Kontrollgruppe a (Abb.4) zeigte einen sigmoiden Verlauf. Im steilsten Anstieg entsprach sie fast einer Geraden.
Der Kurvenverlauf der immunmodulatorischen Gruppe b (Abb. 5) war bis zum 14. Tag fast identisch, danach trat für 6

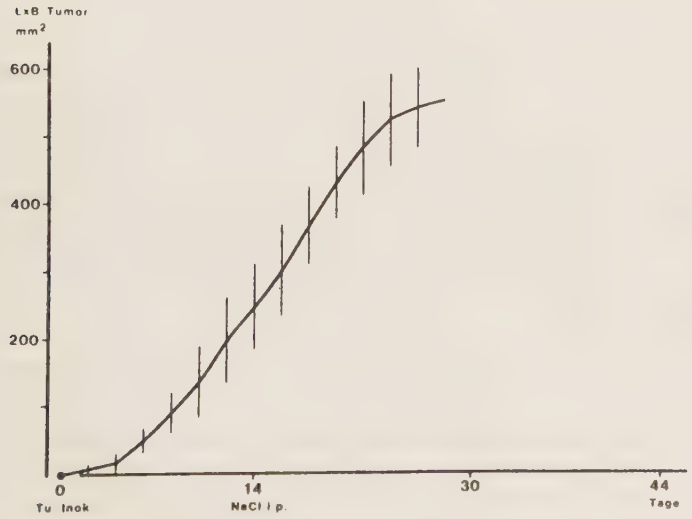


Abb.4: Gruppe a, Oberflächenprodukt (LxB) des subcutan wachsenden LL-Tumors bei Kontrollmäusen (n=10)

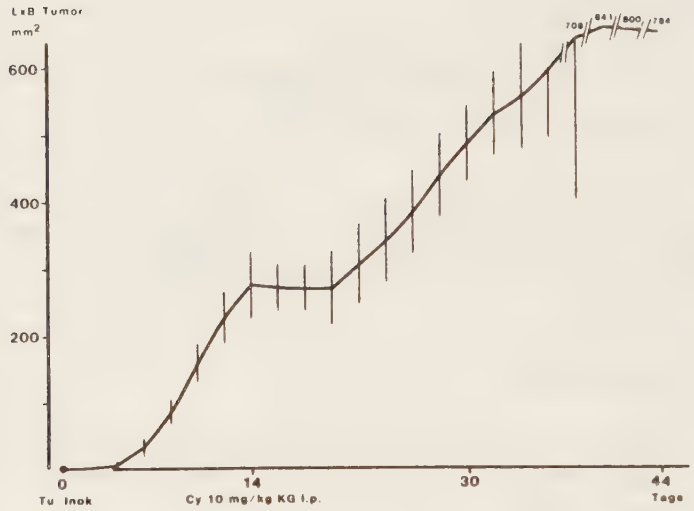


Abb.5: Gruppe b, Oberflächenprodukt (LxB) des subcutan wachsenden LL-Tumors bei Mäusen (n=10) unter Cyclophosphamidtherapie (10mg/kg)

Tage ein Tumorwachstumsstillstand ein. Später wuchs der Tumor unbeeinflußt weiter.

Nach 250mg/kg Cyclophosphamid sistierte der Tumor bei Gruppe c (Abb. 6) zunächst im Wachstum und bildete sich im Verlauf vollständig zurück. Es handelte sich hier nur um ein Kollektiv von 8 Tieren, 2 weitere starben 14 Tage nach Zytostase an Tumorkachexie. In den weiteren Betrachtungen werden für c nur noch die Summenkurven dieser 8 Mäuse besprochen.

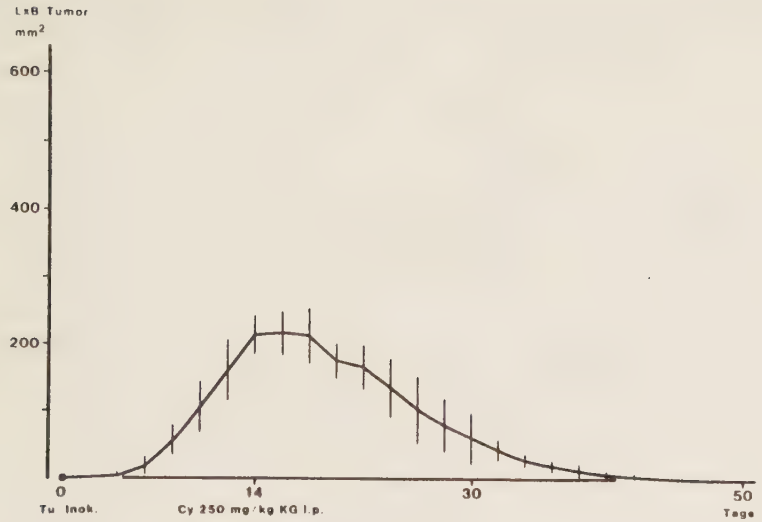


Abb.6: Gruppe c, Oberflächenprodukt (LxB) des subcutan wachsenden LL-Tumors bei Mäusen (n=8) unter Cyclophosphamidtherapie (250mg/kg)

1.2.Gesamtzellen und Lymphozyten

Die Gesamtzellen, das sind alle betrachteten weißen Blutzellen der Milz (WBZ), fielen in Kontrolle a (Abb. 7) über 6 Tage ab, stiegen bis zum 14. Tag an und nahmen danach wieder ab. Die Lymphozyten fielen bis zum 6. Tag zunächst auf 2/3 des Ausgangswertes ab, nahmen nochmals leicht zu und wurden im Verlauf fast vollständig verdrängt. Die Therapie induzierte bei Gruppe b (Abb. 8) eine signifikante Verminderung ($p<0,01$) der Gesamtzellen, während die Lymphozyten davon nicht betroffen waren. Ab Tag 26 bestanden Bedingungen wie bei unbeeinflußtem Tumorwachstum.
Die Zytostase in Gruppe c (Abb. 9) verminderte sowohl die Gesamtzellen als auch die Lymphozyten auf 1/6 des vorherigen Wertes, d.h., neben den Tumor- wurden auch die Milzzellen stark beeinträchtigt. 14 Tage später kam es zu einer

Splenomegalie mit mehr als doppeltem Zellgehalt. Im weiteren Verlauf näherten sich die Zellzahlen wieder langsam ihren Ausgangswerten.

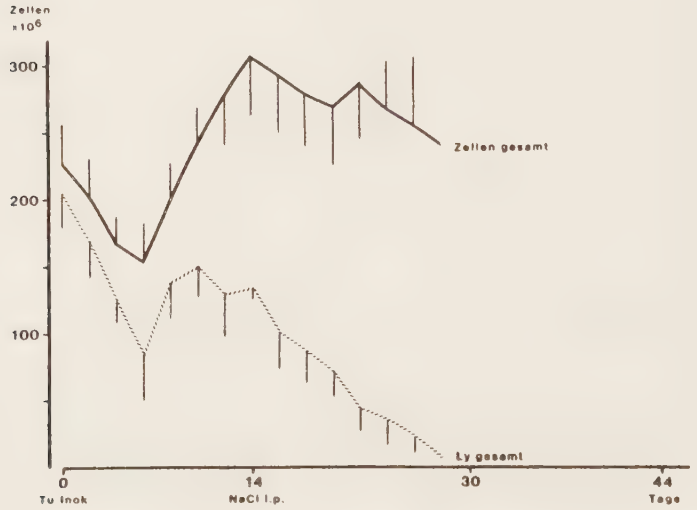


Abb.7: Gruppe a, Verlauf der Gesamtzellen (WBZ) und Gesamtlymphozyten in Milzen tumortragender Kontrollmäuse (n=10)

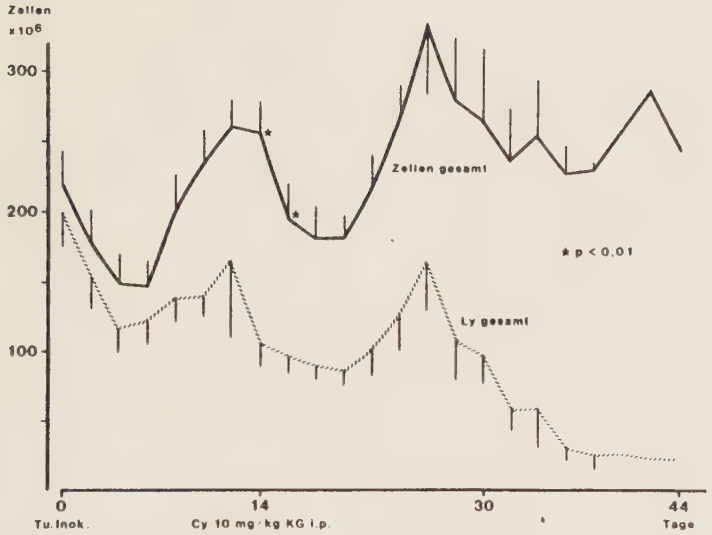


Abb.8: Gruppe b, Verlauf der Gesamtzellen (WBZ) und Gesamtlymphozyten in Milzen tumortragender Mäuse (n=10) unter Cyclophosphamidtherapie (10mg/kg)

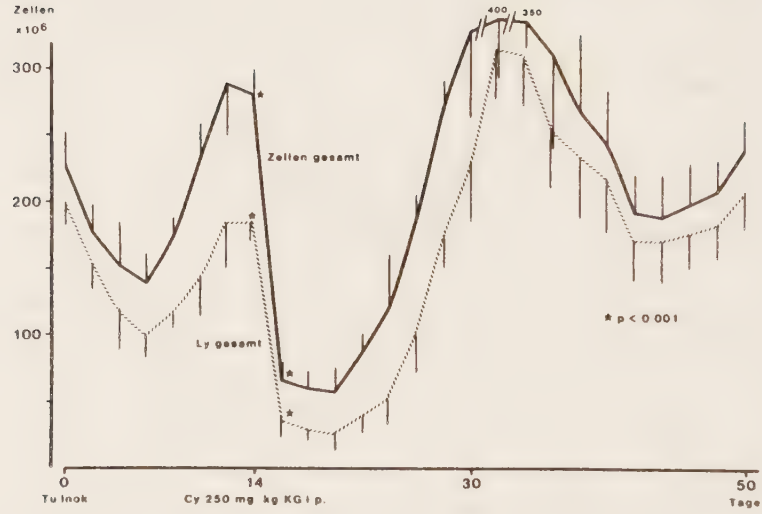


Abb.9: Gruppe c, Verlauf der Gesamtzellen (WBZ) und Gesamtlymphozyten in Milzen tumortragender Mäuse (n=8) unter Cyclophosphamidtherapie (250mg/kg)

1.3.Lymphozytensubpopulationen

Die Lymphozytensubpopulationen zeigten bei ungestörtem Tumorwachstum in Gruppe a (Abb. 10) für Thy 1.2+ Zellen eine konstante Abnahme. Die Lyt 2.1+ Zellen blieben, abgesehen von einem kleinen Gipfel am Tag 8 auf niedrigem Niveau. Die IgG+ Zellen wurden erst ab dem 12. Tag verdrängt. In Gruppe b (Abb. 11) waren die Thy 1.2+ Zellen von der Therapie nicht betroffen, die Lyt 2.1+ Zellen gingen vorübergehend auf 0 zurück. Besonders reduziert waren die IgG+ Zellen, die über mehrere Tage supprimiert wurden.
Die gleichen Populationen wurden bei Gruppe c (Abb. 12) nach Gabe von 250mg/kg Cyclophosphamid fast vernichtet. Sie erholten sich jedoch unterschiedlich schnell mit vorübergehenden Maxima an den Tagen 32 (Lyt 2.1+ und IgG+ Zellen)

und 40 (Thy 1.2+ Zellen) und erreichten wieder Ausgangswerte.

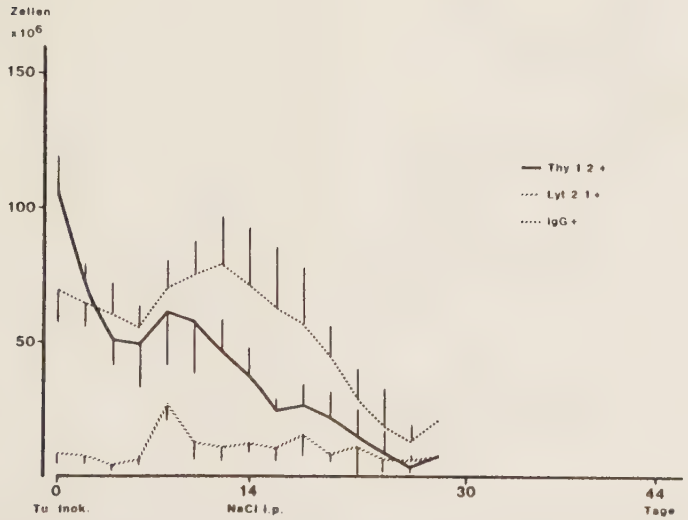


Abb.10: Gruppe a, Lymphozytensubpopulationen in Milzen tumortragender Mäuse (n=10)

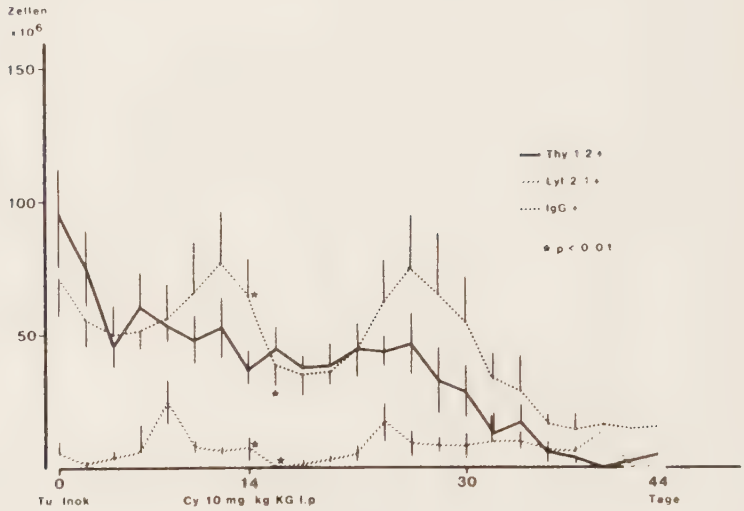


Abb.11: Gruppe b, Lymphozytensubpopulationen in Milzen tumortragender Mäuse (n=10) unter Cyclophosphamidtherapie (10mg/kg)

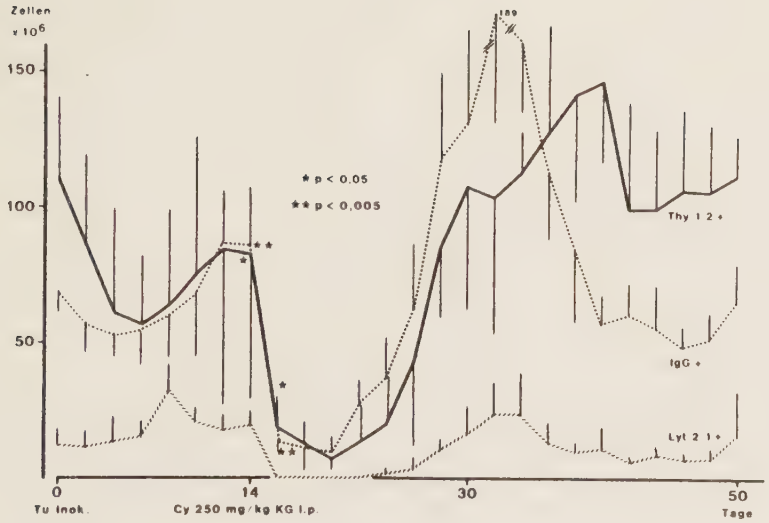


Abb.12: Gruppe c, Lymphozytensubpopulationen in Milzen tumortragender Mäuse (n=8) unter Cyclophosphamidtherapie (250mg/kg)

1.4.Granulozytensubpopulationen

Es wurde hier nur unterschieden zwischen reifen neutrophilen Granulozyten und granulozytären Vorstufen.
Unter Tumorwachstum (Abb. 13) nahmen beide Formen vom 6. Tag an zunächst sehr stark zu, ab dem 18. Tag verdrängten die unreifen die reifen Zellen in der Milz zunehmend.
Bei Gruppe b (Abb. 14) wurden die Vorstufen signifikant ($p<0,05$) um die Hälfte vermindert, während die reifen nicht so stark betroffen waren. Gegen Ende des Versuchs, d.h. bei normaler Tumorproliferation, überwogen die Vorstufen deutlich.
Durch Zytostase wurden in Gruppe c (Abb. 15) beide Formen signifikant ($p<0,001$ bzw. $p<0,005$) reduziert. Die reifen Granulozyten erholten sich schneller und stärker, am Ende

des Versuchs bestanden Normalwerte.

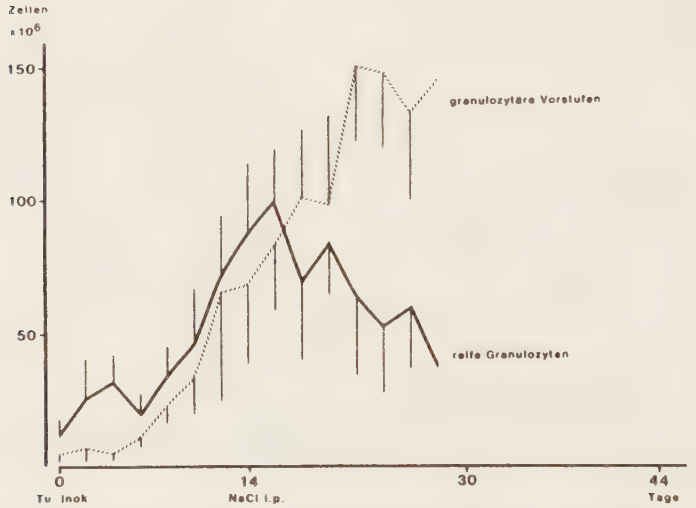


Abb.13: Gruppe a, Granulozytensubpopulationen in Milzen tumortragender Kontrollmäuse (n=10)

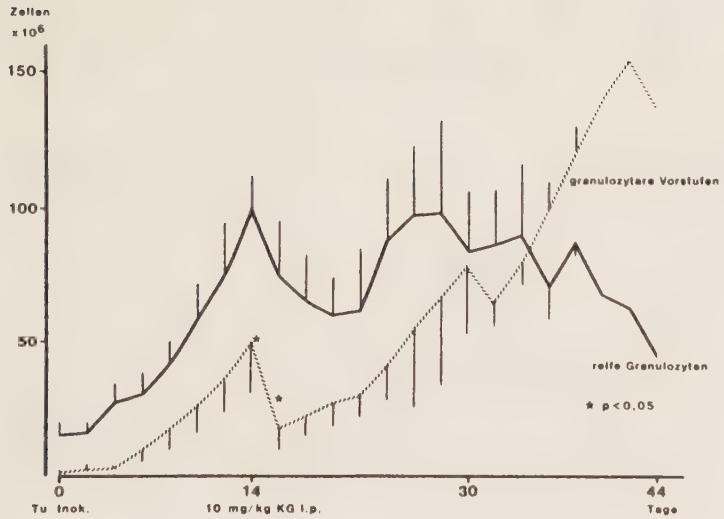


Abb.14: Gruppe b, Granulozytensubpopulationen in Milzen tumortragender Mäuse (n=10) unter Cyclophosphamidtherapie (10mg/kg)

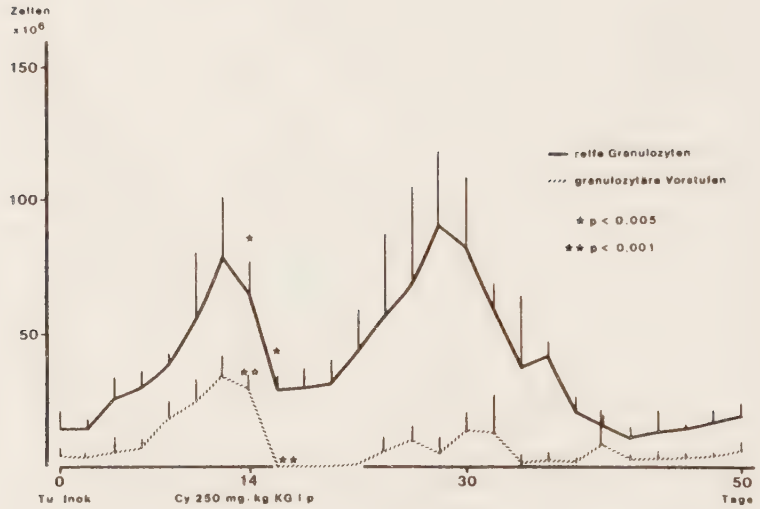


Abb.15: Gruppe c, Granulozytensubpopulationen in Milzen tumortragender Mäuse (n=8) unter Cyclophosphamidtherapie (250mg/kg)

1.5.Phagozytosetest

In den folgenden Abbildungen sind je zwei Kurven eingezeichnet. Die gestrichelte Linie gibt die phagozytierenden Zellen in % bezogen auf die reifen Granulozyten an. Die durchgezogene Linie zeigt die umgerechnete Phagozytose der gesamten Milzzellen.

Bei der Kontrollgruppe a (Abb. 17) fielen bei beiden Kurven je zwei Maxima am 6. und am 18. Tag auf. Später nahm die Phagozytose relativ und absolut bis auf 0 ab.

In Gruppe b (Immunmodulation, Abb. 17) wurde die Phagozytoseleistung nicht vermindert, sie stieg sogar bis zu einem Maximum am 26. Tag an. Im weiteren Verlauf fiel die Phagozytose schon mehrere Tage vor dem Tod der Tiere auf 0 ab.

Auch in Gruppe c (Zytostase, Abb. 18) wurde die Phagozytoseleistung der Granulozyten absolut nur unwesentlich reduziert, relativ stieg sie sogar an. Am Tag 28 kam es zu einem deutlichen Gipfel. Später näherten sich beide Phagozytosekurven wieder den Ausgangswerten.

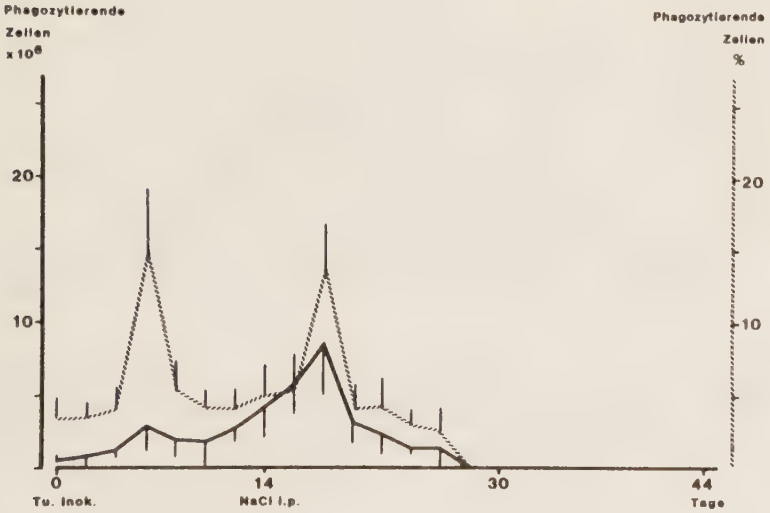


Abb.16: Gruppe a, Anzahl phagozytierender Milzgranulozyten bei tumortragenden Kontrollmäusen (n=10)

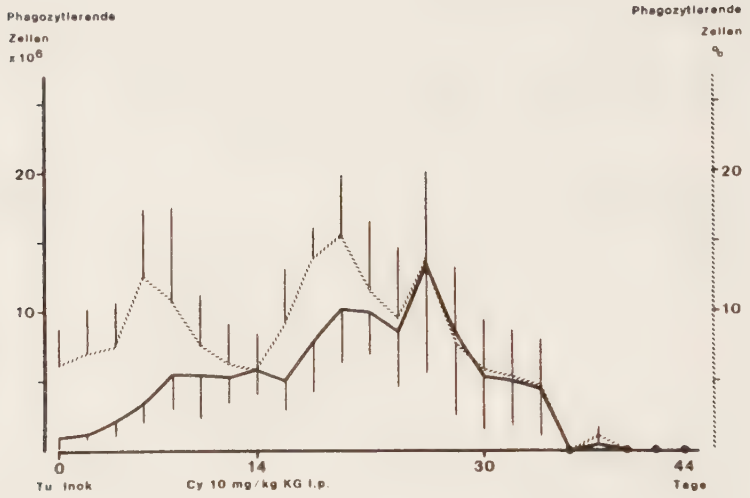


Abb.17: Gruppe b, Anzahl phagozytierender Milzgranulozyten bei tumortragenden Mäusen (n=10) unter Cyclophosphamidtherapie (10mg/kg)

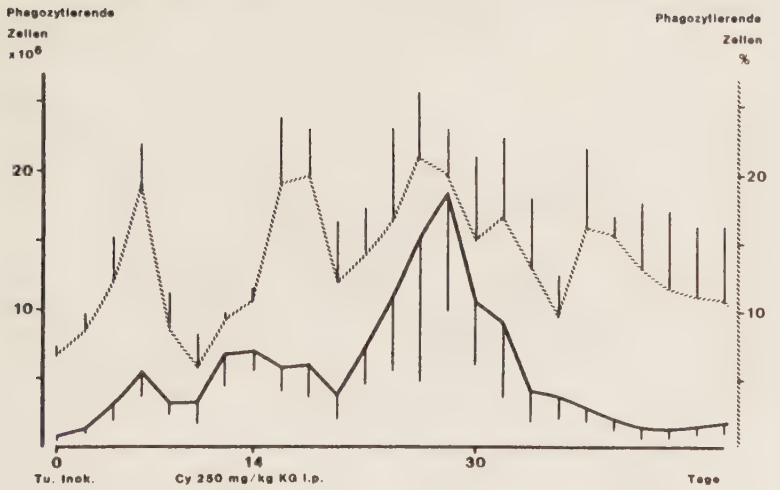


Abb.18: Gruppe c, Anzahl phagozytierender Milzgranulozyten bei tumortragenden Mäusen (n=8) unter Cyclophosphamidtherapie (250mg/kg)

1.6.Peripheres Blut

Die Zellen im peripheren Blut zeigten bei der Differenzierung unter dem Mikroskop einen ähnlichen Verlauf wie die in der Milz. Der Hauptunterschied bestand im weitaus geringeren Auftreten von Vorstufen.
Bei der Kontrollgruppe a (Abb. 19) nahmen die Lymphozyten von der Tumorinokulation an fast linear von etwa 80% auf 30% ab. Zur gleichen Zeit nahmen die Granulozyten reziprok zu.
In Gruppe b (Abb. 20) stiegen die Lymphozyten nach Therapie vorübergehend noch einmal auf Werte um 60% an, 8 Tage später gingen sie auf 30% zurück. Die Granulozyten verhielten sich beinahe spiegelbildlich dazu.
Nach der Zytostase in Gruppe c (Abb.21) sanken die Lympho-

zyten 4 Tage lang ab, die Granulozyten stiegen im gleichen Zeitraum kurz an. Die Rückkehr zu den Ausgangswerten (80% Lymphozyten, 20% Granulozyten) erfolgte sehr langsam.

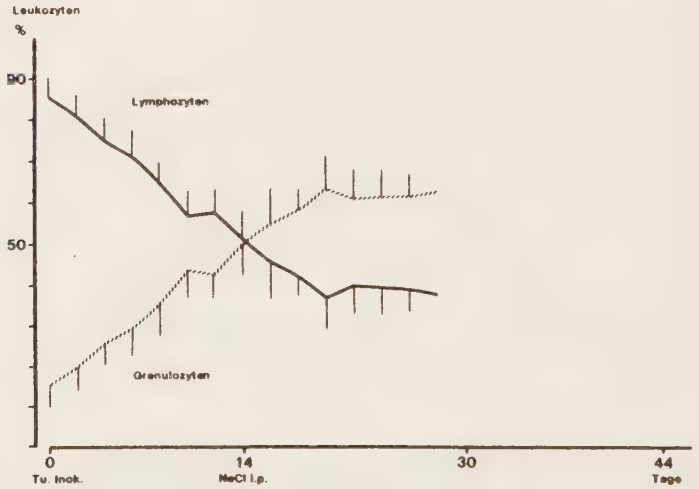


Abb.19: Gruppe a, Verlauf der Blutleukozyten in tumortragenden Kontrollmäusen (n=10)

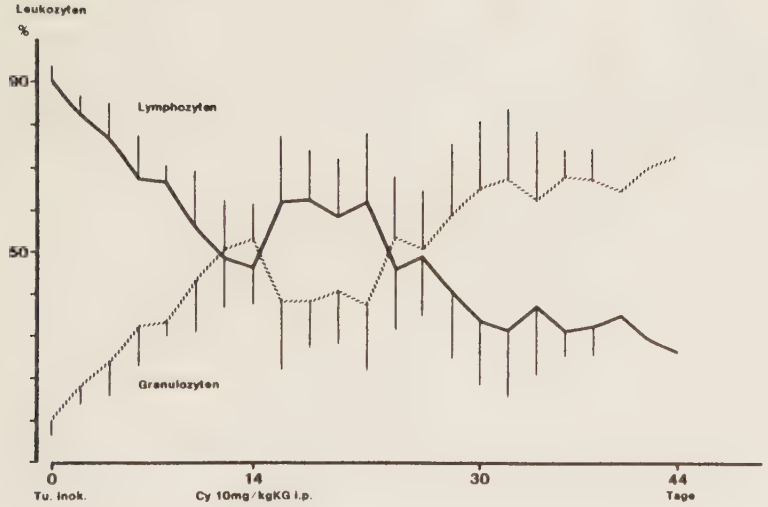


Abb.20: Gruppe b, Verlauf der Blutleukozyten in tumortragenden Mäusen (n=10) unter Cyclophosphamidtherapie (10mg/kg)

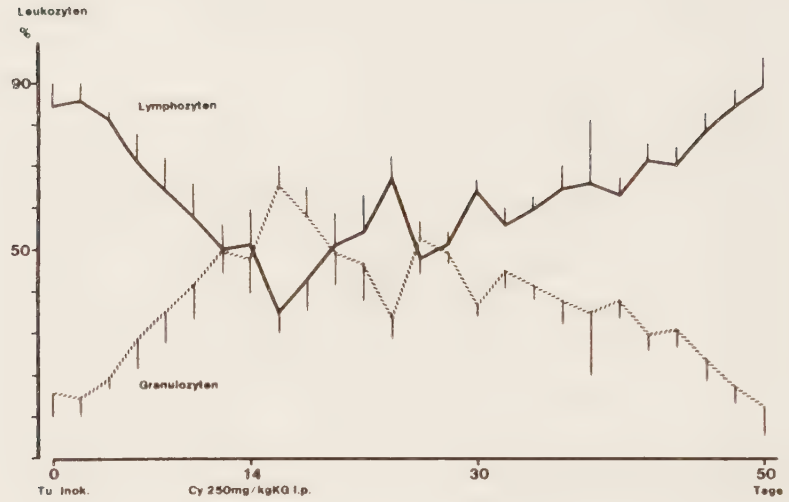


Abb.21: Gruppe c, Verlauf der Blutleukozyten in tumortragenden Mäusen (n=8) unter Cyclophosphamidtherapie (250mg/kg)

2.Versuch II: Splenektomie

2.1.Tumorwachstum

Abb. 22 zeigt das Tumorwachstum, gemessen in LxB, der beiden Kontrollgruppen I und II, Die beiden Kurven sind nahezu identisch. Weder die Scheinoperation noch die Splenektomie hatten einen Einfluß auf die Tumorprolifertion.
Bei den Gruppen III und IV (Abb. 23) fällt auf, daß der Wachstumsstillstand über 6 Tage nur bei den Tieren auftrat, die scheinoperiert wurden. Das Tumorwachstum bei den splenektomierten Mäusen war ungemindert.

2.2. Überlebenszeiten

Die mittleren Überlebenszeiten unterschieden sich im Kontrollversuch (Gruppe I und II) nicht (Ü = 31,0 ± 2,4 Tage bzw. 30,8 ± 3,7 Tage). Der Therapieversuch erbrachte eine deutliche Differenz von 48,0 + 2,8 Tagen zu 32,7 + 3,0 Tagen (Gruppe III und IV).

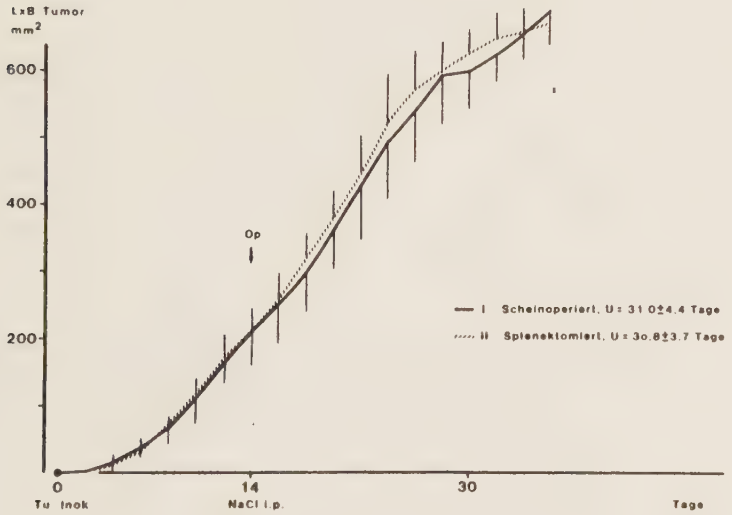


Abb.22: Gruppe I und II, Splenektomieversuch, Oberflächenprodukt des subcutan wachsenden LL-Tumors bei Kontrollmäusen (n=10) nach Scheinoperation (I) bzw. Splenektomie (II)

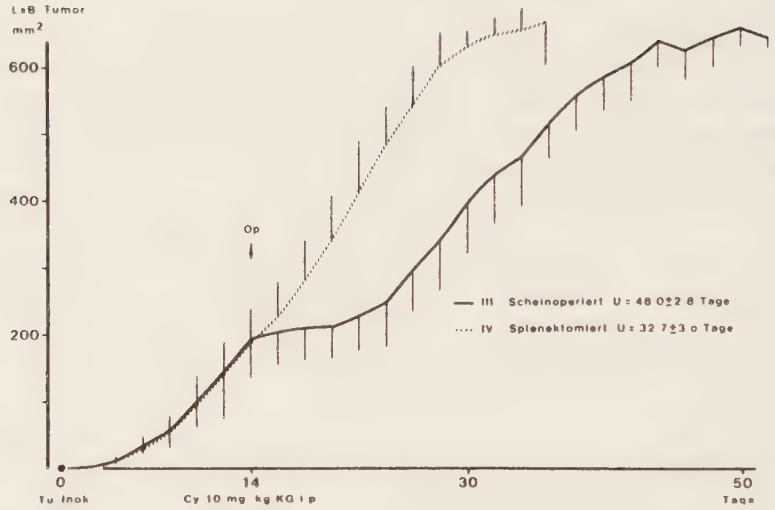


Abb.23: Gruppe III und IV, Splenektomieversuch, Oberflächenprodukt des subcutan wachsenden LL-Tumors bei Mäusen (n=10) unter Cyclophosphamidtherapie nach Scheinoperation (III) bzw. Splenektomie (IV)

3.Versuch III: Winn Assay

Die Bestätigung der Ergebnisse erfolgte im Winn Assay. Abb. 24 zeigt die graphische Darstellung des Tumorwachstums angegeben in LxB der vier verschiedenen betrachteten Gruppen. Die Gruppen I (reine Tumorzellen), II (Tumorzellen und Milzzellen einer tumortragenden Maus) und III (Tumorzellen und Milzzellen einer gesunden Maus) unterschieden sich nur in der Wachstumsgeschwindigkeit und der Überlebenszeit. Am kürzesten lebten die Tiere der Gruppe II mit 22,8 + 1,0 Tagen, gefolgt von Gruppe I mit 29,2 + 1,0 Tagen und Gruppe III mit 32,6 + 1,6 Tagen. Die applizierten Tumoren wuchsen auf allen Mäusen.
Im Gegensatz dazu proliferierte der Tumor der Gruppe IV

deutlich langsamer, hatte am 6. Tag ein Plateau und bildete sich im Laufe von 25 Tagen vollständig zurück. Auch nach einem Zeitraum von 2 Monaten war kein neues Auftreten des Tumors nachweisbar.

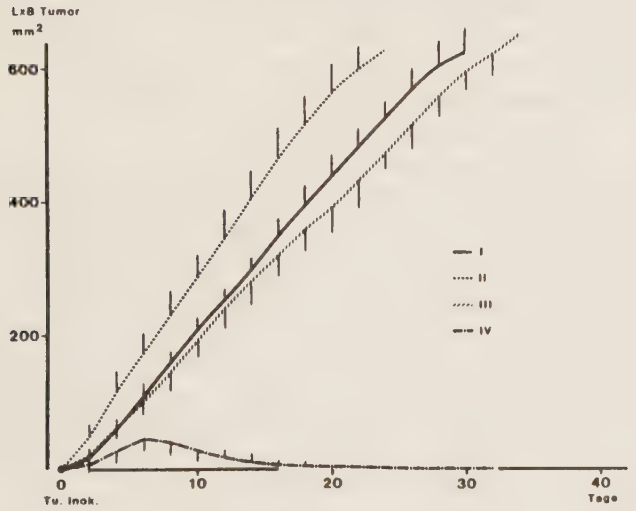


Abb.24: Gruppe I bis IV, Winn Assay, Oberflächenprodukt des subcutan wachsenden LL-Tumors bei Mäusen (n=10) mit

I reinen Tumorzellen

II Tumorzellen und Milzzellen von tumortragenden Mäusen

III Tumorzellen und Milzzellen von gesunden Mäusen

IV Tumorzellen und Milzzellen von Mäusen nach 14 tägigem Tumorwachstum und zusätzlich 2 Tage nach Cyclophosphamidtherapie (10mg/kg)

E.Diskussion

1.Tumorwachstum

Für eine Erfolgskontrolle von Therapiestudien ist es unerläßlich, die Tumormasse möglichst genau zu bestimmen. Bei einem subcutan wachsenden Karzinom ist dies mit der Schublehre sehr einfach und exakt möglich. Die Verhältnisse ändern sich jedoch beim Auftreten von Metastasen. Sie lassen sich in vivo nicht mehr vermessen.
In früheren Versuchen fanden Smith et al. (201), daß das 3LL-Karzinom in C57bl-Mäusen früh, v.a. in die Lunge, metastasiert. Gleichzeitig fand er bedeutende Unterschiede bei der Wirkung von Cyclophosphamid auf einen subcutanen oder intrapulmonalen Tumor. Das in der Lunge befindliche Karzinom war gegenüber dem Zytostatikum deutlich empfindlicher als das unter der Haut gelegene. Der früh metastasierende LL-Tumor in C57bl-Mäusen hätte somit Bedingungen schaffen können, die eine Erfolgskontrolle der Therapie unmöglich gemacht hätten. Die Wiederholbarkeit der Versuche wäre nicht gewährleistet gewesen.
Das hier verwendete Modell, nämlich weibliche NMRI- Mäuse und das schwach immunogene 3-Lewis-Lung-Karzinom (3LL) (223) stellt ein allogenes System dar. Durch ca. 200 Passagen des Tumors auf diesen Mäusen wurde dieser von der C 57bl- Maus an die NMRI- Maus angepaßt. Dies wurde bewiesen, da stärkere Abstoßungsreaktionen bei einer Menge von $5x10^7$ inokulierten Tumorzellen, davon durchschnittlich 40% lebend, nicht beobachtet wurden. Die Angehrate der Tumoren lag bei nahezu 100%.
Eine leichte Graft versus Host Reaktion inhibierte in einem 3LL (C3HxC57bl/6)F1-Maus Modell (33) mäßig die Tumorprogression, die Ausbildung von Lungenmetastasen war jedoch deutlich vermindert im Vergleich zu einer Gruppe mit C57bl/6-Mäusen.
Im vorliegenden Versuch wurden die Tiere nach ihrem Tod, der in 95% der Fälle durch Tumorkachexie (5% Narkosewirkun-

gen) bei fortgeschrittenem Tumorwachstum eintrat, seziert. Makroskopisch bestand kein Anhalt für Metastasen. Damit wurden die Ergebnisse in dem gegenwärtigen Modell bestätigt.
Wegen des ausschließlich subcutanen Wachstums des Tumors waren Therapiewirkungen von Cyclophosphamid gut zu kontrollieren.

1.1.Kontrollgruppe

Ausführliche Kontrolluntersuchungen bezüglich des ungehemmten 3LL-Tumorwachstums in NMRI-Mäusen wurden von Thiel (212) beschrieben. Er stellte fest, daß das Oberflächenprodukt des Tumors, nach dem Zeitpunkt seines Auftretens 4 Tage nach Inokulation, linear bis zum Tod der Tiere etwa am 30. Tag anstieg. Eigene Ergebnisse bestätigten diesen Befund. Der einzige Unterschied bestand in einem späteren Abflachen der Kurve ca. 4 Tage vor dem Tod. Er konnte weiterhin zeigen, daß die Wachstumsgeschwindigkeit mit zunehmender Tumorgröße abnahm. Eine andere Arbeitsgruppe fand nur bis zum 10. Tag ein exponentielles Wachstum des subcutanen LL-Tumors auf C57bl-Mäusen, danach wurde die Proliferationskurve deutlich flacher (137). Die Verdopplungszeit der Tumormasse verlängerte sich von 1,5 Tagen bei 50mg Tumorgewicht auf 21,1 Tage bei 5000mg Tumorgewicht. Weitere (50) beschrieben eine exponentielle Proliferationskinetik des LL-Tumors nur bis zum 10. Tag oder stellten von vornherein kein exponentielles Tumorwachstum fest (6). Sie gaben die Verdopplungszeiten bei einer Tumormasse von 500mg mit 2 Tagen und bei 5000mg mit 9,5 Tagen an.

1.2.Immunmodulatorische Gruppe

Als immunmodulatorisch wirksame Dosen von Cyclophosphamid wurden in der Literatur bisher Werte von 5 bis 30mg/kg angegeben. Bei den durchgeführten Versuchen mit 10 bzw. 20mg/kg Cyclophosphamid konnte ein Wachstumsstillstand des Tumors über 6 Tage beobachtet werden. Nach zweimaliger Applikation des Medikaments am 14. und 20. Tag des Versuchs konnte mit beiden Dosierungen die Tumorproliferation um weitere 6, also insgesamt 12 Tage verzögert werden. Ein kurativer Erfolg war in keinem Fall möglich. 5mg/kg Cyclophosphamid erwiesen sich als unwirksame Dosis.
Ein lang anhaltender zytostatischer Effekt auf die Tumorzellen konnte dabei ausgeschlossen werden. Wie aus der Literatur (46, 53, 207, 210) bekannt war, befinden sich Cyclophosphamid und seine Metaboliten nach Applikation nur wenige Minuten im Plasma bzw in den Organen. Die höchsten Konzentrationen wurden in Plasma, Herz, Leber, Niere (als Hauptausscheidungsorgan) und Milz gemessen. Der indirekte Nachweis, daß niedrige Dosen von Cyclophosphamid nicht zytostatisch wirkten, erfolgte durch den Splenektomieversuch.
Das Tumorwachstum nach Anwendung einer immunmodulatorischen Dosis von Cyclophosphamid wurde in der Literatur widersprüchlich diskutiert. In fast allen Publikationen fehlt der Nachweis, daß diese Dosis nicht direkt zytostatisch wirkte. Nur selten wurden bisher genaue Wachstumskurven nach Therapie angegeben. Sehr wichtig war auch der Zeitpunkt der Applikation des Medikaments. Das LL-Karzinom fand bei solchen Versuchen bisher auch kaum Verwendung.
Die ausführlichsten Untersuchungen führten Hengst et al. (85) allerdings mit einem anderen Tumormodell (Balb/c-Mäuse, MOPC-315-Tumor) als dem unseren durch. Sie verabreichten Cyclophosphamid in verschiedenen Dosierungen zwischen 5 und 300mg/kg, nachdem der subcutan injizierte Tumor eine Größe von 20mm Durchmesser erreicht hatte, was etwa 14 Tage nach Inokulation der Fall war. Sie stellten fest, daß bei 15mg/kg Cyclophosphamid alle Versuchstiere

den Tumor innerhalb von 9 Tagen verloren. 5mg/kg waren noch nicht, 25 und 50mg/kg nicht mehr so erfolgreich wirksam. Erst ab 100 bzw. 200mg/kg war wieder ein voller kurativer Erfolg zu erreichen. 3oomg/kg zeigten bereits deutlich toxische Auswirkungen auf die Tiere. Sie schlossen aus ihren Ergebnissen, daß die Dosis für einen immunmodulatorischen Effekt bei 15mg/kg, die zytostatische über 100mg/kg lag.

Die niedrige Dosis von 15mg/kg hatte allerdings auch keinen Erfolg, wenn sie schon am 4. Tag appliziert wurde. Es fällt auf, daß umso bessere Ergebnisse erzielt wurden, je größer der Tumor war, d.h., je später die Therapie einsetzte. Der Zeitpunkt für die erfolgreichste Behandlung lag zwischen dem 14. und 16. Tag nach Inokulation. Nachfolgende Publikationen aus der selben Arbeitsgruppe bestätigten diese Ergebnisse (152, 153). Die Therapie mit niedrig dosiertem Cyclophosphamid führte im Gegensatz zu zytostatischen Konzentrationen zu einer lang dauernden Immunität gegen den Tumor. Am 1., 6. oder 31. Tag nach Therapie erneut inokulierte Tumorzellen wurden alle abgestoßen. Dieser Befund stellte einen weiteren Anhaltspunkt für die nicht zytostatische Wirkung dar.

In einem anderen Modell erhielten CBA-Mäuse 10^7 BP8-Tumorzellen intraperitoneal (37). Die Therapie, eine Stunde nach Inokulation, bestand aus Cyclophosphamid mit 2, 5 oder 10mg/kg, das in den retroorbitalen Sinus gespritzt wurde. Bereits mit 5mg/kg konnte eine Lebensverlängerung im Vergleich zu den unbehandelten Tieren von durchschnittlich 8 Tagen erzielt werden. Mit 10mg/kg vergrößerte sich die Überlebenszeit um 12 Tage. Eine mehrmalige Applikation von 10mg/kg an den Tagen 0,2, 4, 6, 8 bzw. von 20mg/kg an den Tagen 0 und 2 brachte keinen größeren Vorteil. Bei C3H-Mäusen mit dem gleichen Tumor konnten mit diesen oder höheren Dosen von Cyclophosphamid keine Lebensverlängerung erreicht werden.

Ein Therapieschema bestand aus Cyclophosphamid, das in Konzentrationen von 15, 30 bzw. 60mg/kg bis 14 Tage nach Inokulation verabreicht wurde (71). Am 14. Tag wurde die

Tumorgröße, am 21. Tag die Zahl der Lungenmetastasen in (C57bl/6xDBA/2)F1 Mäusen mit LL-Tumor bestimmt. Unterschieden wurde zwischen normalen und künstlich induzierten Lungenmetastasen. Diese wurden erzeugt, indem die Tiere von Tag 0-8 täglich $3x10^5$ Tumorzellen intravenös verabreicht bekamen. Den größten Erfolg erzielte die höchste verwendete Dosis, die auf alle drei Parameter, Tumorgröße, Lungenmetastasen und künstlich induzierte Lungenmetastasen, bei weitem am stärksten wirkte. Besonders ausgeprägt war der Effekt auf die künstlich induzierten Lungenmetastasen, während diese bei der Gruppe mit 15mg/kg im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe kaum beeinflußt wurden.

Keine oder negative Effekte von niedrig dosiertem Cyclophosphamid sind ebenfalls schon beschrieben.

In einem allogenen Modell (BDF1-Maus und LL-Tumor) kam es nur dann zu kurativen Ergebnissen, wenn die tumortragende Extremität erst mit Hyperthermie behandelt, amputiert und zusätzlich am 16. Tag Cyclophosphamid (25mg/kg) systemisch appliziert wurde (128). Cyclophosphamid und Amputation zeigten gegenüber der Kontrollgruppe (nur Amputation) keinen Unterschied.

DeWys (48) beobachtete bei C57bl/6-Mäusen mit LL-Tumoren nur bei eindeutig zytostatischen Dosen entsprechend 240mg/kg therapeutische Effekte. Eine Behandlung mit 52mg/kg zeigte überhaupt keine Auswirkung auf das Tumorwachstum.

Cyclophosphamid kann auch eine Tumorwachstumsbeschleunigung hervorrufen (67). In Kombination mit anderen Zytostatika wie z.B. Adriamycin, BCNU oder 5-FU war die mittlere Überlebenszeit von DBA/2, Balb/c oder C57bl/6 Mäusen mit LL-Tumor signifikant kürzer als mit den oben genannten Substanzen allein. Im Gegensatz zu anderen Autoren war der Tumor allerdings intraperitoneal implantiert worden.

Ein suppressiver Effekt von Cyclophosphamid in einer Dosis von 50mg/kg konnte im Tiermodell nachgewiesen werden. Gleichzeitig oder 2 Tage nach Implantation von TEPC-183 Tumorzellen in Balb/c-Mäuse führte es zu einer Verstärkung der Tumorproliferation (82).

1.3.Zytostasegruppe

Zytostatisch wirksam sind nach der Literatur Cyclophosphamiddosen von 50 bis 300mg/kg. Bei der Zytostasegruppe bestand das Problem darin, solche Grenzen festzulegen, bei denen man ausschließlich von zytostatischen Effekten ausgehen konnte. Für das LL-Karzinom gab es hierfür nur wenige Veröffentlichungen (48, 50).
Dosen von 100, 200 und 300 mg/kg Cyclophosphamid waren beim MOPC-315 Plasmozytom auf der Balb/c-Maus schon in der niedrigsten Dosis kurativ (85, 152). 300mg/kg entfalteten jedoch deutlich toxische Auswirkungen. 2/3 der Versuchstiere starben.
Alle übrigen Arbeitsgruppen berichteten nur über palliative Erfolge. Wurden 100mg/kg Cyclophosphamid an den Tagen 3, 6 oder 9 nach Inokulation i.p. verabreicht, kam es lediglich zu einer Verlängerung der mittleren Lebensdauer von 7 Tagen (Balb/cxC57bl/6-Mäuse, Meth A-Fibrosarkom) (160). Eine Erhöhung der Dosis auf 160mg/kg, appliziert an den Tagen 6 oder 9, zeigte keine besseren Ergebnisse.
Cyclophosphamid ist auf der anderen Seite auch fähig, einen tumorprotektiven Einfluß auszuüben. 100mg/kg des Zytostatikums, gegeben am Tag der Inokulation (EL 4 Leukämiezellen, C57bl/6 Mäuse), beschleunigten die Tumorproliferation (2). Dies bestätigt unveröffentlichte eigene Ergebnisse bei NMRI-Mäusen mit LL-Tumor. 4 Tage vor Inokulation der Tumorzellen erhielten die Tiere 240mg/kg Cyclophosphamid. Sie lebten danach nur etwa halb so lange wie unbehandelte Kontrolltiere, der Tumor wuchs nahezu doppelt so schnell.
Cyclophosphamid verstärkte in Dosierungen von 50-250mg/kg die Ausbildung von Lungenmetastasen (CBA-Mäuse, FSa-Fibrosarkom) (145). Besonders ausgeprägt war dieser Effekt, wenn das Medikament 1 Tag vor oder 3 bzw. 7 Tage nach Tumorinokulation gegeben wurde. Die Anzahl der Metastasen nahm bei steigenden Cyclophosphamidkonzentrationen bis zu 180mg/kg zu. Über 200mg/kg traten toxische Erscheinungen auf. Es spielte offensichtlich keine Rolle, ob das Medikament intraperitoneal oder intravenös verabreicht wurde.

Smith et al. (201) konnten weder bei 80 noch bei 160mg/kg an den Tagen 6, 8 oder 10 kurative Erfolge erzielen. Die Dosierungen führten zu keiner vollständigen Rückbildung des CBA-SA-F Tumors in den CBA-Mäusen, sondern nur zu einer Verzögerung des Tumorwachstums um maximal 12 Tage.
Für die zytostatische Wirkung von Cyclophosphamid auf das LL-Karzinom in C57bl/6-Mäusen gibt es nur wenige Textangaben (48, 50).DeWys applizierte 52, 86, 144 oder 240 mg/kg des Zytostatikums intraperitoneal am 15. Tag nach Tumorimplantation. Die niedrigste Dosis bewirkte überhaupt keinen Effekt. Ab 86mg/kg trat zwar eine Wachstumsverzögerung, jedoch keine signifikante Lebensverlängerung auf. Dagegen führten 240mg/kg am 21. Tag appliziert zu einer Lebensverlängerung von 15 Tagen. Kein Tier wurde vom Karzinom geheilt (50).
Andere Autoren (137) behaupteten, daß das LL-Karzinom gegenüber Cyclophosphamid und seinen Metaboliten relativ unempfindlich ist. Sie schrieben ihm nur eine sehr begrenzte Wirkung z.B. bei noch kleinem Tumor (400mg) oder als Adjuvans bei chirurgischen Maßnahmen zu. Dies steht im Widerspruch zu den eigenen Ergebnissen. Der LL-Tumor war auf der NMRI-Maus bei 240mg/kg empfindlich, sofern das Medikament 14 Tage nach Tumorinokulation gegeben wurde. Dieser Effekt trat bei 8 von 10 Mäusen auf. D.h., bei 80% der Tiere bildete sich das Karzinom innerhalb von 10 Tagen zurück und entwickelte sich nicht wieder. Die restlichen 20% der Tiere verstarben zum gleichen Zeitpunkt wie die unbehandelten Kontrolltiere, ohne daß eine Wachstumsverzögerung ersichtlich geworden wäre. Die Menge der inokulierten Tumorzellen war im eigenen Versuch mit $5x10^7$ Zellen 10 Mal so groß wie bei DeWys (48). Allerdings machte er keine Angaben über die Vitalität der Zellen. Ein weiterer Unterschied bestand in der Lokalisation des Tumors. DeWys inokulierte intramuskulär in ein Bein und nicht subcutan in die Brustwand. Die Wachstumsgeschwindigkeit, gemessen als Oberflächenprodukt oder als Durchmesser der Tumoren, war trotz der geringeren Zahl von inokulierten Zellen höher, sodaß am Tag der Therapie eine größere Tumormasse bestand.

Weiterhin metastasierte das LL-Karzinom im syngenen Wirt sehr schnell in die Lunge (48) im Gegensatz zum eigenen allogenen Modell, bei dem keine Metastasen gefunden wurden. Eine einzige Veröffentlichung berichtet über deutliche Empfindlichkeit des LL-Karzinoms in der C57bl/6-Maus. Durch zwei Dosen Cyclophosphamid von 100mg/kg am 12. und 18. Tag konnte man die mittlere Überlebenszeit um 11 Tage gegenüber den Kontrollen steigern. Die Behandlung war in keinem Fall kurativ. Noch bessere Erfolge wurden durch eine Kombinationstherapie mit LPS oder anderen Immunmodulatoren erreicht (1).

2.Zelluläre Veränderungen in der Milz

2.1.Kontrolle

Die Zellpopulationen der Milz waren unter Tumorwachstum großen Schwankungen unterworfen. Ausgiebige Untersuchungen im gleichen Tumor-Wirt-System von Lersch und Thiel (118, 119, 120, 122, 123) bewiesen gute Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen. Unterschiede entstanden hauptsächlich im zeitlichen Auftreten von Maxima bzw. in der quantitativen Ausprägung. So wird ein Maximum der Gesamtzellen schon einen Tag früher beschrieben. Die berechneten Gesamtzellen in der zweiten Hälfte des Versuchs lagen um das 1,5- bis 2-fache über den hier gezeigten Werten. Auffällig waren die erheblich größeren Standardabweichungen. Ähnliches gilt für die Gesamtlymphozyten und Lymphozytensubpopulationen. Die Autoren stellten beispielsweise ein Maximum der Gesamtlymphozyten und IgG+ Zellen um den 20. Tag fest. Dieses konnte nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung läge in einem relativ raschen Auftreten und Verschwinden oder einer raschen Fluktuation dieser Zellpopulationen. Die Untersuchungsintervalle betrugen 2 Tage. Nach Berechnungen (212) wäre es durchaus denkbar, daß die genannten Zellveränderungen zwischen den durchgeführten Biopsien stattfanden.

Ein Maximum der Thy 1.2+ Zellen am 31. Tag konnte in den eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden, da die Tiere zu diesem Zeitpunkt bereits alle gestorben waren. Sehr gute Übereinstimmung zeigt ein Vergleich des Verlaufs der Lyt 2.1+ Zellen. Ein beschriebener Gipfel am 27. Tag konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Die unter LL-Tumorwachstum einsetzende Granulozytose und Granulozytopoese in der Milz unterschieden sich von den publizierten Ergebnissen (212) nur in einer schnelleren zeitlichen Abfolge. Ein Maximum der reifen Granulozyten wurde bereits am 16. nicht erst am 22. Tag beobachtet. Eine Erklärung hierfür könnte eine rasche Auswanderung der Zellen aus der Milz in den Tumor sein. Eine längere Verweildauer im zirkulierenden Blut darf wohl ausgeschlossen werden, weil entsprechende Zellveränderungen im peripheren Blut nicht nachgewiesen wurden.

Die Zellen des Reifungs- und Proliferationspools wurden, der Einfachheit wegen, nicht getrennt dargestellt, sondern unter dem Begriff der granulozytären Vorstufen subsummiert. Das stetige Anwachsen dieser Zellpopulation ab dem 4. Tag zur vorherrschenden Zellart in der Milz entsprach den schon früher erhaltenen Ergebnissen (212).

Die Zellfluktuationen unterschieden sich zwischen subcutan verlagerten und intraabdominell gelegenen Milzen nur unwesentlich. Diese Veränderungen begannen in der intraabdominell gelegenen Milz ca. einen Tag früher und waren quantitativ etwas stärker ausgeprägt. Die qualitativen Veränderungen waren jedoch gleich. Als Erklärung diente die durch die subcutane Verlagerung hervorgerufene leichte Stauung der Milz (212).

Die erythropoetischen Vorstufen zeigten, auf absolute Zahlen umgerechnet, einen relativ konstanten Anteil von 2 bis 10 Millionen Zellen pro Milz. Sie unterlagen nicht wie andere Zellarten starken Schwankungen, abgesehen vom Zeitraum der letzten 6 Tage, in dem sie bis auf 60 Millionen Zellen pro Milz anstiegen. Sie wurden deshalb nicht dargestellt, weil sie für immunologische Vorgänge als nicht relevant erachtet wurden.

Monozytäre Vorstufen, reife Monozyten und Makrophagen traten in der Milz nur zu etwa 1-3% auf. Um Fehlinterpretationen bei der mikroskopischen Differenzierung zu vermeiden, wurde zusätzlich die Peroxidasefärbung durchgeführt. Eine mögliche Erklärung für die geringe Zahl an Makrophagen fanden Otu et al. (163). Seren von LL-tumortragenden Mäusen bzw. Überstände von kultivierten LL-Zellen enthielten Faktoren, welche die Makrophagenkoloniebildung von Knochenmarkzellen hemmten. Ein weiterer Grund könnte in der Produktion von Prostaglandin E durch das LL-Karzinom liegen (239, 241). Dieses Prostaglandin ist dafür bekannt, daß es in vitro die Vermehrung von Monozyten bzw. Makrophagen hemmen kann.

Die Splenomegalie unter Tumorprogression wurde schon mehrmals beschrieben. Sie trat entweder als unspezifischer Ausdruck der Tumorabwehr auf (30, 86, 218, 229, 240) oder sie konnte bestimmten Zellarten wie Makrophagen (21, 114), Lymphozyten (68, 115, 184), Granulozyten (10, 116) oder erythropoetischen Vorstufen (229) zugeordnet werden. Die in der Literatur beschriebenen Fluktuationen von Milzzellen verschiedener Tumor-Wirt-Systeme sind in folgendem Schema zusammengefaßt:

Zellart							
Erythropoese	-	-	-	-	-	-	↑
B-Zellen	-	-	↑	↑	↓	-	-
T-Zellen	-	↑	-	↑	↓	-	-
Granulozyten	-	-	-	-	↑	↑	↑
Makrophagen	↑	-	-	-	-	-	-
Literatur	(21) (114)	(184)	(68)	(115)	(116)	(10)	(229)

Schema : Zellfluktuationen in den Milzen von Tieren unter Tumorwachstum

↑ bedeutet Vermehrung

↓ bedeutet Verminderung

\- symbolisiert keine Veränderungen

Wirt-Tumor-Modelle:

(21) : Balb/c, MPC-11

(114): Balb/c, MTV induziertes Mamma Ca

(184): C3H/HeJ, spontanes Mamma Ca

(69) : CBA/H-TG, Ehrlich Ascites Tumor

(115): CBA, WEHI-64 Fibrosarkom

(116): Balb/c, CE 1460 Mamma Ca

(10) : C57bl/6, LL-Tumor

(229): C57bl/6cumBR, LL-Tumor

Das Schema veranschaulicht sehr deutlich die Abhängigkeit der zellulären Vorgänge in der Milz vom Tumor-Wirt-System.

2.2. Immunmodulatorische Gruppe

Morphologische Veränderungen von Milzzellen unter Cyclophosphamidtherapie wurden in der Literatur bis jetzt nicht beschrieben. Das Interesse der Autoren, welche sich bisher mit niedrig dosierter Cyclophosphamidtherapie beschäftigt haben, lag bei funktionellen Tests. So wurden z.B. Suppressor- und Effektorzellen in vivo und in vitro nachgewiesen.

Stellvertretend sei hier die Arbeitsgruppe um Mokyr genannt (84, 85, 150, 152, 153, 233). Ihre Ergebnisse ließen sich mit den eigenen, was die Morphologie der Milzzellen betrifft, nicht vergleichen.
In den aktuellen Versuchen waren die Gesamtzellen, die IgG+ Zellen, die Lyt 2.1+ Zellen und die granulozytären Vorstufen 2 Tage nach Therapie signifikant vermindert. Dies könnte prinzipiell durch zwei Vorgänge erklärt werden: Auswanderung der Zellen aus der Milz oder Vernichtung durch Cyclophosphamid.
Im Differentialblutbild des peripheren Blutes ließ sich nach Therapie ein sprunghafter Anstieg der Lymphozyten nachweisen, die Granulozyten nahmen ab. In der Milz wurde die Anzahl der IgG+ und Lyt 2.1+ Lymphozyten besonders stark reduziert, während Thy 1.2+ konstant blieben. Aus der Literatur ist jedoch bekannt (205), daß Ig+ Lymphozyten nicht rezirkulieren, d.h., der relative Anstieg im peripheren Blut müßte auf T-Lymphozyten zurückzuführen sein. Des weiteren verschwanden aus der Milz besonders granulozytäre Vorstufen, die reifen Granulozyten blieben nahezu konstant. Im Blut ließ sich 2 Tage später jedoch keine relative Zunahme der Granulozyten zeigen. Als mögliche Erklärung bliebe z.B. eine Auswanderung von Zellen in den Tumor. Cyclophosphamid besitzt nach der Literatur in der angewandten Konzentration keinen zytostatischen Einfluß. Eine direkte Zerstörung der Zellen darf damit ausgeschlossen werden.
Ozer et al. (165) fanden beim Menschen, daß in vitro durch 4-OH-Cyclophosphamid (0,02nmol/ml - 20nmol/ml) die Differenzierung von OKT4+ OKT8- Präsuppressorzellen verzögert war. Dies würde mit der Konstanz der Thy 1.2+ T-Zellen und der Abnahme der Lyt 2.1+ Zytotoxischen/Suppressorzellen in den eigenen Untersuchungen sehr gut übereinstimmen. B-Zellen waren ebenfalls gegen mäßige Dosen empfindlich, wohingegen Suppressor- und Effektorfunktionen auch durch sehr hohe Dosen von 4-OH-Cyclophosphamid nicht unterdrückt werden konnten.
Die Reduktion der granulopoetischen Zellen stimmt mit in

vitro Untersuchungen (170) gut überein. CFU-S und CFU-GM aus Milzen von NMRI-Mäusen waren nach in vitro Anwendung von 4-OH-Cyclophosphamid bzw. ASTA-Z-7557, einem in vitro aktiven Abkömmling von Cyclophosphamid, vermindert.
In gewissem Widerspruch dazu steht, daß die CFU im Femur 1 Tag nach Cyclophosphamidtherapie (50mg/kg) eines LL-Karzinoms in einer C57bl-Maus sogar leicht erhöht waren (50). Ebenfalls etwas abweichend von unseren Resultaten sind die von Jakobisiak (97) publizierten Ergebnisse. CFW Spendermäuse erhielten 2, 4 und 6 Tage vor Entnahme der Milz je 60mg/kg Cyclophosphamid. Bei den vorher bestrahlten (531 rad) Empfängertieren wurden 9 Tage nach Erhalt der Zellen die CFU im Knochenmark und in der Milz sowie das Milzgewicht gemessen. Im Vergleich zur Kontrolle waren die CFU im Mark leicht, in der Milz stark erhöht, das Milzgewicht war aber nahezu halbiert.

2.3.Zytostasegruppe

Die Wirkung von zytostatischen Dosen Cyclophosphamid auf die Milz wurde erstmals von Turk et al. (221) beschrieben. C3H/Bi-Mäusen bzw. Meerschweinchen erhielten Cyclophosphamid in einer Dosis von 300mg/kg. Dabei zeigte sich im histologischen Schnitt ein starker Effekt auf nicht T-Zellareale in der Milz sowie im Lymphknoten. Auch eine dreimalige Gabe von 300mg/kg konnte die thymusabhängigen Gebiete nicht beseitigen. Dies gelang erst, als die Tiere zusätzlich neonatal thymektomiert wurden.
Bei einer Dosis von 400mg/kg Cyclophosphamid (206) nahm das Milzgewicht von (C57xA)F1-Mäusen vom 1.- 7. Tag nach Applikation bis auf ein Viertel ab, am 9. Tag betrug das Milzgewicht das Doppelte des Ausgangswertes. Im Laufe von zwei Wochen normalisierte es sich wieder. B-Zellareale wurden durch Cyclophosphamid zerstört, T-zellabhängige erschienen histologisch unberührt.
Ähnliches wurde für die Milzen von Syrischen Hamstern nach Applikation von 300mg/kg Cyclophosphamid beschrieben (55).

B-Zellareale waren vorübergehend vollständig beseitigt, T-Zellareale wurden nicht ganz verdrängt. Vom 3. Tag an wanderten myeloische Vorstufen, Makrophagen und sogar Megakaryozyten in die Milz ein, was am 9. Tag zu einer Splenomegalie und der vollständigen Zerstörung der Milzstruktur führte. Der 11. Tag war gekennzeichnet durch das Erscheinen von kleinen lymphozytenartigen Zellen. Ab dem 15. Tag restaurierte sich die ursprüngliche Milzstruktur wieder.
Zwei andere Arbeitsgruppen (139, 147) veröffentlichten, daß die gesamten Milzzellen nach 300 bzw. 200mg/kg Cyclophosphamid bei Balb/c- bzw. (C57blxC3H)F1-Mäusen stark abnahmen. Sie normalisierten sich aber wieder nach einem Stadium der Splenomegalie.
Derselbe Verlauf ergab sich bei C3H/He-Mäusen mit 300mg/kg Cyclophosphamid (108). Neben den Gesamtzellen wurden noch solche, die sich durch Thy 1.2- bzw. Ig- Antikörper markieren und zusammen mit Komplement lysieren ließen, differenziert. Die Ig+ Zellen stellten, außer am 2. und 3. Tag, die Mehrzahl, d.h. bis zu 70% der Milzzellen. Thy 1.2+ Zellen überwogen nur am 2. und 3. Tag, ansonsten lag ihr Anteil zwischen 5 und 20%. Diese Resultate widersprechen den eigenen in mehreren Punkten. Die Kurve der Gesamtmilzzellen zeigte ein Maximum erst am 18. und nicht am 9. Tag. Die absoluten Zellzahlen, 50 Millionen Zellen pro Milz bei Versuchsbeginn, lagen sehr deutlich unter den eigenen Werten. Außerdem dominierten die B-Zellen in den aktuellen Versuchen nicht in dem Ausmaß. Das vorübergehende Überwiegen der Thy 1.2+ gegenüber Ig+ Zellen kurz nach Zytostase entspricht hingegen den eigenen Ergebnissen.
Die selbe Arbeitsgruppe berichtete zusätzlich über den Vergleich von immunkompetenten C3H/He, nackten und B-Mäusen (C3H Mäuse, thymektomiert, tödlich bestrahlt und mit Knochenmark rekonstituiert) nach Zytostase mit Cyclophosphamid (108). Am 10. Tag war die Splenomegalie bei den nackten Mäusen am ausgeprägtesten, die Thy 1.2+ Zellen gingen bei allen fast auf 0 zurück, während Ig+ Zellen maximal 70% betrugen. Interessant war der Effekt bei den nackten Mäusen. Trotz der ausgeprägten Milzgröße ließen

sich erwartungsgemäß keine T-Zellen, aber auch nur 1,2% B-Zellen nachweisen. Nullzellen stellten somit über 98% der Milzpopulation dar, bei den B-Mäusen wie bei den immunkompetenten waren es nur 30%.
Cyclophosphamid bzw. ASTA-Z-7557 wirkte stark auf CFU-S und CFU-C im Femur von (CBAxC57bl)F1-Mäusen. Beide Substanzen führten zu einem Minimum von CFU-S und CFU-C am Tag 2, Cyclophosphamid zu einem weiteren 5 Tage später. 6 Tage lang nach Applikation waren keine myelopoetischen Zellen in der Milz nachweisbar (162).
Unter gleichzeitigem Tumorwachstum ergaben sich ähnliche Ergebnisse wie bei tumorfreien Tieren. Bei C3H/HeJ-Mäusen mit MC43-Fibrosarkomen bewirkte eine Gabe von 100mg/kg Cyclophosphamid 1 Tag nach den Tumorzellen eine Verminderung der Milz- und Lymphknotenzellen auf 30% am 5. Tag im Vergleich zur Kontrolle (242).
Einen Zusammenhang zwischen der Erhöhung der Cyclophosphamiddosis und der Verminderung von CFU im Femur von C57bl/6-Mäusen zeigte eine Veröffentlichung (50). Die CFU reagierten im Femur schneller als die anderen Zellen.
Untersuchungen von Lymphozytensubpopulationen in Milzen von Mäusen unter Tumorprogression und Therapie mit Cyclophosphamid (100mg/kg) führten bei D1-DMBA-3-Mammakarzinom tragenden Balb/c-Mäusen und tumorfreien Tieren zu einer signifikanten Reduktion der Gesamtzellen in der Milz (127). Thy 1.2+ und Ig+ Zellen verringerten sich ebenfalls signifikant. Diese Beobachtungen entsprechen den eigenen mit gewissen Unterschieden in den Größenordnungen der Zellveränderungen. Im gegenwärtigen Versuch nahmen Thy 1.2+ und IgG+ Zellen bis zu 90% ab. Man muß aber in Rechnung stellen, daß die verwendete Dosis zweieinhalbmal größer war. Ein Nachteil dieser Studie ist das Fehlen der Angabe über den genauen Therapiezeitpunkt und das Tumorstadium.
Schon 1 Tag nach 200mg/kg Cyclophosphamid wurden die Gesamt- wie die Ig+ Zellen in den Milzen von C57bl/6-Mäusen mit LL-Tumor um die Hälfte reduziert (168). Die Anzahl der Lyt 2.2+ T-Zellen (zytotoxische und Suppressorzellen) und der L3T4+ Zellen, einer weiteren T-Zelle, waren erhöht. Die

Lyt 2.2+ Zellen entsprechen bei einem anderen Mäusestamm den Lyt 2.1+ Zellen des eigenen Versuchs. Auch 4 Tage später waren die beiden Subtypen, im Vergleich zur Kontrolle, noch vermehrt. Erst eine Woche danach zeigten beide wieder Normalwerte. Dies steht im deutlichen Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen, bei denen Lyt 2.1+ Zellen über 6 Tage nach Therapie nicht nachweisbar waren. Eine mögliche Erklärung dafür könnten die unterschiedlichen Wirtsysteme bieten.

Einen Einblick in das korrespondierende Geschehen im Tumor gibt eine weitere Studie (58). Während an den Tagen 6, 10 und 18 nach Tumorinokulation (C57bl/6J Mäuse, MCA 76-9 Tumoren) Makrophagen den Hauptteil der Immunzellen im Tumor stellten, T-Lymphozyten mit weniger als 5% keine Rolle spielten und Granulozyten erst am 18. Tag von 5 auf 15% anstiegen, änderte sich dieses Verhältnis in präimmunisierten Tieren. Die Tiere erhielten 10^6 Tumorzellen s.c., der gewachsene Tumor wurde 10 Tage später chirurgisch entfernt. Die T-Lymphozyten vermehrten sich von < 5 auf 30% am 6. Tag, fielen danach aber wieder auf 5% am 18. Tag ab. Nach zusätzlicher Gabe von 240mg/kg Cyclophosphamid am 10. Tag stiegen sowohl die T-Lymphozyten auf 35% als auch die Makrophagen auf 45% am 18. Tag an.

Dieses Beispiel zeigt, daß Cyclophosphamid die Zellpopulationen nicht nur in den Milzen und den lymphatischen Organen, sondern auch in den Tumoren veränderte. Möglicherweise könnten Zellwanderungen durch gleichzeitige Beobachtung von Milz und Tumor unter Markierung von z.B. T-Zellen genauer analysiert werden.

3.Phagozytoseleistung der Milzzellen

3.1.Kontrollgruppe

Zur Zeit gibt es noch keine Literatur über das Phagozytoseverhalten von Granulozyten der Milz unter LL-Tumorwachstum. Aus diesem Grund sollen die Ergebnisse mit der im gleichen Modell schon früher gemessenen Chemilumineszenzaktivität verglichen werden (213). Mit dem gegenwärtigen Phagozytosetest wurden bei der Kontrolle 2 Maxima der Aktivität am 8. und 18. Tag festgestellt. Das bestätigte den Verlauf der Chemilumineszenzmessungen. Danach sanken Phagozytose- wie Chemilumineszenzaktivität auf subnormale Werte ab, obwohl die Anzahl der Granulozyten in der Milz erhöht war. Nachdem sich aus der Chemilumineszenzaktivität der Milzzellen kein Zusammenhang mit dem Tumorwachstum herstellen ließ, schrieb man diesen Effekt der in der Milz vorherrschenden Population von unreifen Granulozyten zu. Wie schon vorher bekannt war, sind granulopoetische Vorstufen weit weniger in der Lage Sauerstoffradikale freizusetzen als reife Zellen (105). Anhand des Phagozytoseversuchs konnte diese Vorstellung ergänzt werden. Es zeigte sich ganz eindeutig, daß zum einen nur reife Zellen phagozytierten, zum anderen die Phagozytoseleistung wenige Tage vor dem Tod der Tiere abnahm. Monozyten und Makrophagen spielten dabei keine Rolle.

Einen positiven Einfluß übte möglicherweise der "Phagocytosis Stimulating Factor" aus, der kürzlich beschrieben wurde (96). Er wird von Granulozyten sezerniert und fördert die Phagozytoseleistung von Makrophagen in vitro. Stimuliert werden dadurch die "Ingestion" und das "Attachment" der Makrophagen. Andere Funktionen wie die Freisetzung von Sauerstoffradikalen, Chemotaxis, Adhärenz oder Enzymabgabe sind nicht betroffen.

Die Phagozytose könnte möglicherweise auch von homologem Leukozyten Interferon (HLIFN) gesteigert werden (140). In vitro Versuche mit menschlichen Granulozyten nach Inkubation mit HLIFN legten dies nahe.

Lymphokine können die Superoxidproduktion erhöhen (193). Nach Klostergaard et al. (106, 107) vermögen Lymphokine auch andere Zellfunktionen anzuregen wie z.B. die Phagozytose.

Stimulierte Granulozyten könnten andererseits durch Freisetzung von Elastase, Trypsin und Wasserstoffperoxid die eigenen Fc und C3b Rezeptoren an der Zellwand schädigen (78). Die Konsequenz wäre eine Herabsetzung der Phagozytoseleistung.

Des weiteren besteht eine negative Korrelation zwischen der Höhe des IgG-Spiegels und der Phagozytoseleistung im Blut von Tumorpatienten (62). Auch Immunkomplexe könnten zu einer Verminderung der Phagozytose beitragen. Während des Tumorwachstums treten sie im Blut und anderen Organen auf (16). Nach Inkubation mit Immunkomplexen wurde die durch Bakterien hervorgerufene Sauerstoffradikalfreisetzung von Granulozyten erniedrigt (135).

Als zusätzlicher Faktor kämen für die Veränderungen der Phagozytoseleistung die Prostaglandine in Betracht. Prostaglandine der E-Gruppe, die sowohl vom LL-Tumor selbst (239) als auch von Makrophagen in der Milz gebildet werden (167), könnten die Phagozytoseleistung einschränken (237, 238, 241).

Die Phagozytoseleistung von Makrophagen und Monozyten im C57bl-LL-System (163) sank unmittelbar nach Tumorinokulation ab. Ein nachfolgender Anstieg bis zum 9. Tag wurde von einem Rückgang abgelöst. Diese Ergebnisse korrelieren wenig mit den eigenen.

Mit zunehmendem Alter nehmen Zellfunktionen ab. Davon betroffen war auch die Phagozytoseleistung der Granulozyten, die von jungen und älteren Probanden stammten. Die Aktivität der Zellen aus älteren Probanden war signifikant reduziert im Vergleich mit den jungen (156). Ein solcher Effekt dürfte beim aktuellen Versuch keine Rolle spielen, da die Mäuse bei Versuchsende maximal 5 Monate alt waren.

Alle genannten Faktoren könnten den Verlauf der Phagozytoseleistung in den gegenwärtigen Untersuchungen erklären.

3.2.Immunmodulatorische Gruppe

Die Phagozytoseleistung der Milzgranulozyten zeigte 6 und 12 Tage nach Therapie Maxima. Direkt nach Therapie stieg die Aktivität an. D.h., auch nachdem das Tumorwachstum wieder einsetzte war die Phagozytose erhöht. Es konnte kein Zusammenhang zwischen Phagozytose und LL-Wachstum hergestellt werden.
Der direkte Anstieg nach Therapie könnte durch erhöhtes Tumorantigen im Blut, das durch verstärkte aktive Zellzerstörung durch Immunzellen im Tumor auftrat, verursacht worden sein. Relevante Literatur zu diesem Thema liegt derzeit nicht vor.

3.3.Zytostatische Gruppe

Charakteristisch war der sprunghafte Anstieg der Phagozytose trotz verringerter Anzahl von Granulozyten 2 Tage nach Therapie.
Cyclophosphamid inhibiert in hohen Dosen die Phagozytoseleistung und andere Funktionen wie Zellwanderung oder Freisetzung von Sauerstoffradikalen durch Makrophagen (91). Die ADCC von Milzgranulozyten konnte durch eine hohe Dosis des Zytostatikums (200mg/kg) jedoch nicht vermindert werden (127).
Eine Reduzierung von Immunkomplexen durch Cyclophosphamid (205) könnte die Phagozytose möglicherweise erhöhen (52, 204).
Nach Baggiolini (7) kann die Phagozytoseaktivität theoretisch an folgenden Stellen beeinflußt werden:

a)Störung von Stimulus/Phagozyten-interaktion
  z.B. durch Behinderung der Opsonierung; im aktuellen Versuch spielte das jedoch keine Rolle, weil opsonierte Cymosanpartikel erst in vitro mit Phagozyten inkubiert wurden und damit nicht mit Cyclophosphamid in Berührung kamen

b)Inhibition von Mediatorsynthese oder -sekretion

z.B. könnte die Synthese von Mediatoren durch Alkylierung der produzierenden Enzyme beeinflußt werden

c)Blockade von Mediatoraktivität

z.B. könnten Rezeptoren oder deren Expression verändert werden (168)

Exakte Daten in der Literatur über den genauen Angriffspunkt des Cyclophosphamids liegen jedoch nicht vor.

4.Zelluläre Veränderungen im peripheren Blut

4.1.Kontrollgruppe

Die Leukozytenzahlen stiegen im Blut unter LL-Tumorwachstum sehr deutlich an (212). Dies ereignete sich parallel zur Entwicklung der Splenomegalie. 4 Tage nach Tumorinokulation erreichten die Lymphozyten ein Maximum. Genau zum gleichen Zeitpunkt trat das Minimum der Lymphozyten in der Milz auf. Ab dem 10. Tag bestimmten v.a. granulozytäre Vorstufen das Blutbild.

In den Differentialblutbildern, in denen die Lymphozyten normalerweise ca. 80-90% der peripheren Leukozyten darstellen (229), zeigte sich von Anfang an ein beinahe kontinuierlicher Rückgang auf etwa 10%. Umgekehrt dazu stiegen die Granulozyten und deren Vorstufen von ca. 10 auf 80% an, wobei die Vorstufen die Überzahl stellten. Diese Befunde stimmen mit denen der eigenen Kontrollgruppe weitgehend überein. Auffällig, im Gegensatz zu früheren Ergebnissen (212), war der deutlich geringere Zuwachs an granulozytären Vorstufen. Es wurden überwiegend reife Zellformen gefunden. Andere Arbeiten (10, 240) unterstützen diese Befunde nur teilweise. Zwar kam es zu einer Vergrößerung der Milz, aber zu keiner Erhöhung der Blutleukozytenzahlen im C57bl/6-LL-Modell. Im Gegensatz dazu stiegen die CFU im Femur und in der Milz an. Das Differentialblutbild blieb unverändert. Es war hauptsächlich von Granulozyten bestimmt.

Weinberg et al. (229) publizierten Ergebnisse, die den hier gewonnenen weit mehr entsprechen (C57bl/6-Maus, LL-Tumor).

Neben der schon erwähnten Splenomegalie kam es auch hier zu einer Vermehrung der Leukozyten im peripheren Blut, die v.a. auf Granulozyten zurückzuführen war. Im Knochenmark nahmen die CFU zunächst stark zu, im späteren Verlauf fielen sie auf subnormale Werte ab.
Eine weitere Arbeitsgruppe stellte im gleichen Tumormodell neben einer Splenomegalie auch eine Vermehrung von Neutrophilen im Blut und CFU im Femur fest (9). Sie zeigten kein verändertes Verteilungsmuster im Vergleich zu einer nicht tumortragenden Vergleichsgruppe.

4.2. Immunmodulatorische Gruppe

In den eigenen Versuchen war 2 Tage nach Cyclophosphamidtherapie (10 oder 20mg/kg) eindeutig ein sprunghaftes Ansteigen der Lymphozyten im peripheren Blut von etwa 40% auf 70% zu sehen. Diese Erscheinung blieb über 6 Tage bestehen. Genauso lang war das Tumorwachstum gehemmt. Danach fielen die Lymphozyten wieder ab. Die Granulozyten zeigten einen beinahe spiegelbildlichen Verlauf zu den Lymphozyten.
Versuche mit ähnlich niedrigen Dosen des Medikaments bei Mäusen wurden bisher nur einmal veröffentlicht (50). Es wurden CFU im Femur bei C57bl/6-Mäusen, die 21 Tage lang ein LL-Karzinom trugen, untersucht. Mit einer Dosis von 50mg/kg vermehrten sich die CFU sogar leicht. Bei höheren Dosen fielen sie deutlich ab. 50mg/kg Cyclophosphamid führten im Gegensatz zu höheren Dosen zu keiner Reduktion der Leukozyten im peripheren Blut.
Zwei Arbeiten, die sich mit der Anwendung von niedrig dosiertem Cyclophosphamid beim Menschen beschäftigten, seien hier noch erwähnt.
Die Auswirkungen verschiedener Dosen von Cyclophosphamid auf Granulozyten, T3+, T4+, T8+, B1+ und Ia+ lymphozytäre Zellen des peripheren Blutes erforschten Bast et. al. (12). Die Dosierungen lagen bei 0, 50, 100, 200, 400 und 600mg/m^2. Die Untersuchungen wurden an 5 Melanompatienten

vorgenommen. Erst ab 100mg/m^2 traten signifikante Veränderungen auf. Am empfindlichsten waren B1+, gefolgt von T8+ und Ia+ Zellen. Am wenigsten beeinträchtigt waren Granulozyten und T3+ bzw. T4+ Zellen, die erst ab 600mg/m^2 signifikant vermindert wurden. Interessant war das Verhältnis von T4+/T8+ Zellen. Dieser Quotient schwankte zwischen 0,8 und 6 je nach Patient und Dosis, ohne einem Gesetz zu folgen.
Berd et al. (18) untersuchten nach Therapie mit 300mg/m^2 Cyclophosphamid die peripheren Lymphozyten auf T4 und T8 Marker und unternahmen Funktionsprüfungen. Sie testeten die Lymphozyten auf die ConA induzierte Suppressoraktivität und die Proliferation auf PHA. Die ConA induzierte Suppressoraktivität war am 3. Tag signifikant vermindert und fiel weiter ab bis über den 19. Tag hinaus. Die Proliferation auf PHA war dagegen nicht gestört. Die Anzahl der zirkulierenden Lymphozyten wurde von dieser Konzentration ebenso wie T4+ und T8+ Zellen und der Quotient T4+/T8+ nicht berührt.

4.3.Zytostasegruppe

Bei der zytostatischen Dosierung von Cyclophosphamid (250mg/kg) mußte zwischen zwei Gruppen unterschieden werden: Tiere mit und ohne Tumor.
Bei den Mäusen ohne Tumor änderte sich an den relativen Zahlen im Differentialblutbild nichts, obwohl die absoluten Zellzahlen sanken.
Mit 300mg/kg Cyclophosphamid behandelte C3H/Bi-Mäuse hatten 3 Tage nach Therapie einen Tiefpunkt der absoluten Lymphozytenzahlen von 10% des Ausgangswertes (221). Im Anschluß daran kam es zu einem Reboundphänomen der absoluten Lymphozytenzahlen. Derselbe Effekt trat bei Meerschweinchen auf, die mit der gleichen Dosis behandelt wurden.
(CBAxC57bl)F1-Mäuse ohne Tumor erhielten zunächst 100-500mg/kg Cyclophosphamid oder ASTA-Z-7557 (162). Es trat bei beiden Substanzen mit steigender Konzentration ein

exponentieller Rückgang der CFU-S und CFU-C im Femur auf. Bei 200mg/kg Cyclophosphamid oder ASTA-Z-7557 erreichten die weißen Blutzellen daraufhin in beiden Gruppen ein Minimum von 50% des Ausgangswertes am 3. Tag. Sie erholten sich wieder auf Normalwerte und fielen ab dem 26. Tag erneut ab. Die separierten mononukleären Zellen hatten ein Minimum schon am 2. Tag. Mit ASTA-Z-7557 wurde ein stärker ausgeprägtes Minimum erzielt. Die Messung der CFU demonstrierte einen klaren Unterschied zwischen den verwendeten Zytostatika. ASTA-Z-7557 bewirkte sowohl bei CFU-S als auch bei CFU-C nur ein Minimum, Cyclophosphamid erzeugte je zwei.

Eine andere Gruppe (170) unternahm in vitro Versuche mit 4OH-Cyclophosphamid und ASTA-Z-7557. Sie aspirierten CFU-S bzw. CFU-GM und inkubierten sie im Reagenzglas mit einem der beiden Zytostatika. CFU-GM tendierte bei beiden mit höherer Dosis gegen 0. Am unempfindlichsten erwiesen sich jene CFU-S, die nach Inkubation mit einem Zytostatikum in tödlich bestrahlte Mäuse gespritzt und erst am 12. Tag gezählt wurden. Sie erreichten 70% des Kontrollwertes, während die am 8. Tag abgelesenen der anderen Gruppe nur etwa 10% aufwiesen.

In NMRI nu/nu Mäusen, die einen menschlichen Tumor, z.B. ein kleinzelliges Bronchialkarzinom, trugen, entwickelte sich 3 Tage nach Cyclophosphamidtherapie ein Minimum der peripheren Leukozytenzahlen (136). 2 Tage später wurden wieder Ausgangswerte erreicht, anschließend trat ein Reboundphänomen auf.

DeWys et al. (50) behandelten C57bl/6-Mäuse mit LL-Karzinomen am 21. Tag mit 240mg/kg Cyclophosphamid mit dem Erfolg eines Minimums der Leukozyten 4 Tage später. Die CFU im Femur erreichten es bereits 1 Tag nach Applikation. Sehr auffällig war die unterschiedliche Ausprägung der Blutleukozyten bei tumortragenden und -freien Tieren. Die tumorfreien hatten ihr Minimum bereits 2 Tage nach Zytostase und es war bei weitem nicht so stark ausgeprägt wie bei den tumortragenden.

5.Der Einfluß der Milz auf das Tumorwachstum

Splenektomieversuche (117, 121) zeigten nur dann einen hemmenden Einfluß auf das Tumorwachstum, wenn die Splenektomie entweder vor oder maximal 3 Tage nach Tumorinokulation durchgeführt wurde. Das Ergebnis bestätigten auch andere (178).
Der tumorprotektive Einfluß der Milz bestand also nur zu Anfang der Tumorproliferation. Dies könnte mit der allmählichen Umwandlung der Milz von einem lymphatischen zu einem myeloproliferativen Organ zusammenhängen. Damit verlöre die Milz ihre ursprüngliche Funktion. Eine weitere Erklärung dieses Effekts läge in der Übernahme der Tumorprotektion durch andere Organe des lymphoretikulären Systems wie z.B. durch Lymphknoten oder durch das Knochenmark (240). Es wurde bewiesen, daß das Tumorenhancement auch ohne Milz ausgelöst werden kann (181).
Als denkbare Ursache wäre auch die besondere anatomische Situation der Milz zu nennen. Sie ist als einziges lymphatisches Organ direkt in den Blutstrom eingeschaltet. Deshalb ist sie in der Lage, auf im Blut vorhandene Tumorantigene (16) am schnellsten zu reagieren (225). Die Milz stellt immerhin etwa 2/3 des lymphatischen Gewebes der Maus dar (205).
In der Literatur wurde der Einfluß der Splenektomie auf das Tumorwachstum widersprüchlich beurteilt. Es stellten sich jedoch drei Hauptergebnisse heraus. Von besonderer Wichtigkeit war neben dem zeitlichen Abstand zwischen Splenektomie und Tumorinokulation (110, 161, 232) auch die Anzahl der inokulierten Tumorzellen (36, 146, 159). Die Verwendung von allogenen Tumor-Wirt-Systemen zeitigte ebenfalls Unterschiede (26, 60, 181). Abstoßungsreaktionen, GvH-Reaktionen und verlangsamtes Tumorwachstum wurden beschrieben.
Keine so überragende Rolle spielt die Milz bei spontanen oder chemisch induzierten Tumoren (36).
Eine Folgerung war, daß B-Zellen der Milz das Tumorwachstum fördern (212). Das könnte möglicherweise durch die Produk-

tion von "Enhancing Antibodies" geschehen. Solche Antikörper der IgG-Klasse wurden bereits beschrieben (100, 101). Möller et al. (148) konnten sie in einem allogenen System ebenfalls entdecken. Daneben wurde bewiesen, daß transplantierte Tumoren in histoinkompatiblen Wirten einen Teil ihrer H2-Oberflächenantigene verloren, was zu einer erhöhten Resistenz gegen zytotoxische Antikörper führte. In dem hier vorliegenden allogenen Tumor-Wirt-Modell könnten B-Zellen auf diesem Weg zur Tumorprotektion beigetragen haben.

Die Milz enthält nach bisherigen Erkenntnissen Suppressorzellen. Die Publikationen waren bisher jedoch uneinheitlich in Bezug auf das zeitliche Auftreten und den Phänotyp dieser Zellen.

Ein möglicher Grund könnte in den verschiedenen Tumor-Wirt-Modellen liegen. Die Vielzahl der verwendeten Methoden läßt ebenfalls nur begrenzt Vergleiche zu.

Mehrere Autoren berichteten über das zeitliche Auftreten von Suppressorzellen (13, 131, 186, 218) unter Tumorwachstum. Alle beschrieben nach Tumorinokulation zunächst eine erhöhte Zytotoxizität von Milzzellen in vivo (131, 186, 218) und in vitro (13), später folgte das Tumorenhancement. Das Zeitintervall wurde nur sehr unscharf angegeben für die verstärkte Zytotoxizität (0.-12. Tag nach Tumorinokulation) und das Enhancement (1.-4. Woche nach Tumorinokulation). Die oben genannten Autoren stehen damit alle im Widerspruch zu den Splenektomieversuchen (117, 121). Dabei ergab sich eine verlängerte Lebenszeit der Tiere, wenn die Milz kurz vor oder an den folgenden 3 Tagen nach Tumorinokulation entfernt wurde. Zu späteren Zeitpunkten war die Splenektomie indifferent. Es wäre jedoch zu beachten, daß neben zellulären auch humorale Faktoren beim Tumorenhancement eine Rolle spielten. Die unterschiedlichen in vivo und in vitro Ergebnisse könnten damit relativiert werden.

T-Zellen mit Suppressorfunktion konnten erst mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern genauer definiert werden. So fanden einige Autoren (43, 93, 154) das Thy 1 oder Thy 1.2

Antigen auch auf Suppressorzellen. In Anwesenheit vieler derartiger Zellen sistierte allerdings das Tumorwachstum in den eigenen Versuchen. Dieser Befund wurde eindrucksvoll im Winn Assay bestätigt.

Der Lyt-Phänotyp wurde bei verschiedenen Mäusestämmen mit Lyt 2+3+ (28), Lyt 2.2+ (43) über Lyt 1+2-, Lyt 1-2+, Lyt 1+2+ (93) bis Qa 1+ (154) sehr weit gefaßt. Lyt 2.2 entsprach dem Lyt 2.1 unseres Versuchs, Lyt 1+2- wurde schon von anderen Autoren als Helfer- bzw. Effektorzelle bezeichnet (59, 158, 164, 236). Es hängt damit zusammen, daß in verschiedenen Maussystemen die Lyt-Phänotypen verschieden definiert sind.

Die Wirkung solcher Suppressorzellen auf Effektorzellen wurde beschrieben (63, 157, 220).

Suppressorzellen beeinflußten demnach hauptsächlich unreife oder Vorläufer von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) (63). Unreife CTL könnten sich in Milz und Lymphknoten unter dem Einfluß von Suppressorzellen nicht zu vollwertigen CTL weiterentwickelt haben (220). Erst nach Auswanderung in den Tumor und bei direktem Antigenkontakt erfolgte dieser Schritt. Milzzellen von Mäusen, die mit allogenen Milzzellen immunisiert waren, verstärkten zwar nicht die zytotoxische Reaktion in der Empfängermilz, sie halfen aber, einen Tumor mit denselben H2-Antigenen beschleunigt abzustoßen. Die Zytotoxizität war nur im Tumor, jedoch nicht in der Milz erhöht (157). Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen, daß eine solche Immunisierung zur Bildung von unreifen Effektorzellen führte, die dann nach direktem Antigenkontakt nachreiften.

Milz-T-Zellen können aber nicht nur über einen direkten Zellkontakt suppressiv wirken, sondern auch über Mediatoren. T-Zellen von C57bl-Mäusen unter LL-Tumorwachstum (219) bilden einen solchen Faktor. Er erwies sich als unspezifisch.

Makrophagen spielen nicht nur als antigenpräsentierende Zellen oder als Phagozyten eine wichtige Rolle, sondern sind möglicherweise auch als Suppressorzellen aktiv.

Unter MOPC-315-Tumorwachstum nehmen die Makrophagen in der

Milz von Balb/c-Mäusen zu. Ein Entfernen dieser Zellen durch Sephadex G-10 Adhärenz erhöhte die Immunantwort in vivo wie in vitro. Das Suppressionsphänomen war spezifisch (235). Die Ergebnisse wurden bestätigt (93, 99). Makrophagen aus dem Peritonealexsudat von Kontrolltieren wirkten ähnlich suppressiv (99).
Einen Hinweis auf die immunologischen Verbindungen von Milz und Knochenmark als Mitverursacher einer Immunsuppression gaben Young et al. (240). LL-C3-Tumorzellen können CSF sezernieren. Diese Aussage stand im Einklang mit der unter LL-Wachstum einhergehenden gesteigerten Hämatopoese. Bei größerem Tumorgewicht wurde jedoch die T-Zell Blastogenese gehemmt. Die hierfür verantwortlichen Knochenmarkszellen waren nicht an Nylonwolle adhärent und nicht lysierbar mit Thy 1.2 Antikörper und Komplement.

6.Wirkungen von Cyclophosphamid auf die Zellpopulationen und deren Funktionen

6.1.B-Zellen

Cyclophosphamid unterdrückt in zytostatischer Dosierung die IgM vermittelte Plaquebildung gegen Schaferythrozyten (193). Allgemein spielen der Zeitpunkt der Antigenexposition und die Konzentration von Cyclophosphamid eine entscheidende Rolle.
Ratten wurde entweder 1 Tag vor oder 2 Tage nach dem Antigen Dinitrophenol (DNP) eine zytostatische Dosis Cyclophosphamid gegeben. Nur die Tiere mit vorheriger Applikation des Medikaments zeigten eine Verstärkung der humoralen Immunantwort, während diese bei den anderen Gruppen sank (211).
Diese Cyclophosphamid abhängige verstärkte Immunantwort gegen Schaferythrozyten trat nur auf, wenn maximal 100mg/kg verabreicht wurden. Bei Dosen darüber sank die Immunreaktion drastisch ab (104).
Chiorazzi et al. (38) untersuchten die IgG- und IgE-Produk-

tion nach Cyclophosphamidgabe von 175mg/kg am Tag 0 und Sensibilisierung gegen DNP-KLH am Tag 2. IgE war noch nach 2 Wochen supprimiert. 3 Wochen später war IgE auf das 8-fache und 7 Wochen danach immer noch auf das doppelte erhöht. IgG war dagegen zu allen genannten Zeitpunkten erniedrigt.

Die Wirkung von Cyclophosphamid gegeben zum Zeitpunkt der Antigenapplikation auf IgG1- und IgG2-Antikörperproduktion gegen DNP war unterschiedlich (54). Während die Produktion von IgG2 supprimiert war, blieb die von IgG1 unberührt. Wurde jedoch mit Cyclophosphamid vorbehandelt, war die IgG2-Produktion gesteigert, die von IgG1 blieb normal.

Schon 1mg Cyclophosphamid pro Tier reichte aus, die primäre Antwort von tumortragenden Mäusen gegen Typ 3 Pneumokokken-Polysaccharid (SSS-III) zu supprimieren. Dies gelang auch, wenn der Versuch nach 30 Tagen wiederholt wurde. 3mg pro Tier unterdrückte sowohl die primäre wie auch die sekundäre Immunantwort gegen DNP-Hämocyanin (82).

200mg/kg Cyclophosphamid führten zur Unterdrückung der sekundären IgG-Antwort bei Mäusen, während die primäre IgM-Antwort normal blieb (139).

Nach Vorbehandlung mit 20mg/kg des Zytostatikums wurden zelluläre Reaktionen wie DTH verändert, die Antikörperantwort aber blieb unbeeinflußt (3).

Die Existenz einer alleinigen B-Suppressorzelle darf verworfen werden, obwohl verschiedene Autoren (102, 113) einen gewissen Anhalt dafür gefunden haben. B-Zell defiziente Mäuse erreichten die gleichen gesteigerten zellulären Antworten wie normale Tiere nach Cyclophosphamid Applikation (31, 130).

In den eigenen Versuchen wuchs der LL- Tumor bei bestehender großer Anzahl von B-Zellen in der Milz stets unbeeinflußt (212). Nach den oben zitierten Autoren (3) darf für die niedrige Dosis von Cyclophosphamid (10mg/kg) ein Einfluß auf die B-Zellen ausgeschlossen werden. D.h., der vorübergehende Stop der Tumorproliferation hing nicht von der Beeinflussung von B-Zellen ab, sondern von anderen zellulären Faktoren.

Die Tumorregression nach Zytostase (250mg/kg) kann nicht durch einen B-Zell-vermittelten Effekt auf den Tumor erklärt werden, da die B-Zellen von dieser Dosis ebenfalls voll getroffen wurden (104). Eine dadurch möglicherweise hervorgerufene verminderte Produktion von "Enhancing Antibodies" könnte jedoch dazu beigetragen haben.

6.2.Helferzellen

Cyclophosphamid kann Helferzellen hemmen (141, 142, 143). Nach Verabreichung von 100-200mg/kg des Medikaments i.p. in C57bl/6-Mäuse wurden in vitro und in vivo Versuche zusammen mit Milzzellen durchgeführt. Es stellte sich keine erhöhte Zytotoxizität gegen allogene Tumorzellen ein. Die dafür verantwortlichen Effektorzellen konnten sich nicht vermehren. Der Zusatz von MLC-Überständen stimulierte die zytotoxische Antwort. Damit war bewiesen, daß Helferzellen in dieser Konzentration von Cyclophosphamid beeinflußt werden. Die Dosis lag einerseits über der für B-Zellen, andererseits unter der für reife T-Zellen kritischen Grenze. Ly 1+ Zellen konnten die durch Cyclophosphamid supprimierte Antwort in vitro durch Stimulation der zytotoxischen T-Lymphozyten erhöhen (144) genauso wie die Zugabe von Interleukin II in vitro wie in vivo. Die direkte Einwirkung von Cyclophosphamid auf Interleukin II produzierende Zellen lag deshalb nahe. Greenberg et al. (75) bestätigten die Vermutung, daß Lymphokin-produzierende Zellen (Lyt 1+2-) oder Interleukin II für die volle therapeutische Erhöhung der Zytotoxizität verantwortlich waren. Während Lyt 2+ zytotoxische T-Zellen zu einem sehr begrenzten Erfolg führten, potenzierte die Zugabe von Interleukin II die antitumorale Antwort (77).
Nicht immer konnte durch Gabe von Interleukin II eine Proliferation der T- Zellen induziert werden. Mit Cyclophosphamid behandelte Milzzellen exprimierten offensichtlich den Interleukin II Rezeptor nicht vollständig , wie sich aus Versuchen mit Antikörpern gegen Interleukin II -

Rezeptoren ergab (168).
Eine Cyclophosphamidtherapie (150mg/kg) vor Antigenkontakt (DNP) der Spendertiere führte auch nicht zur gesteigerten zytotoxischen Antwort. Aus diesem Grund wurde die Beeinflussung einer sehr kurzlebigen Inducerzelle für die fehlende Stärkung der Zytotoxizität verantwortlich gemacht (226).
In den eigenen Versuchen war die Cyclophosphamiddosis so hoch angesetzt (250mg/kg), daß auch eine direkte Wirkung auf Effektorzellen zu erwarten war. Möglicherweise kann deshalb die Beeinflussung der Helferzellen vernachlässigt werden.

6.3.Effektorzellen

Bei den Effektorzellen muß zwischen mehreren Arten unterschieden werden, nämlich zytotoxischen T-Lymphozyten, NK-Zellen, Makrophagen/Monozyten, Granulozyten und B-Zellen.
Reife zytotoxische T-Lymphozyten waren wiederholt gegenüber hohen Dosen von Cyclophosphamid resistent (77, 141, 142, 143, 144, 168, 221, 226), wenn auch ihre Vermehrung gestört wurde (75, 77, 127, 142, 168). Der antiproliferative Effekt beruht wahrscheinlich auf der Beeinflussung der Vorläufer bzw. der Interleukin II produzierenden Zellen.
Die NK-Aktivität in Mäusen wurde durch mittlere und hohe Dosen von Cyclophosphamid gehemmt (133, 174). Sie erholte sich jedoch sehr schnell wieder. Das gleiche wurde bei Hamstern und Ratten nachgewiesen (47). Ein möglicher Ansatzpunkt der Wirkung wäre die Abhängigkeit der NK-Zellen von Interleukin II (40, 41).
Mit der Wirkung von Cyclophosphamid auf Zellfunktionen von Makrophagen befassen sich mehrere Arbeiten.
Haskill et al. (81) schrieben der Substanz in zytostatischer Dosis (200mg/kg) eine deutliche Senkung der ADCC zu. Beim Meerschweinchen sank unmittelbar nach Applikation von 500mg/kg die ADCC signifikant ($p<0,05$) ab, erholte sich jedoch schon 2 Tage später wieder (11). Andererseits beein-

flußten weder 100mg/kg noch 200mg/kg Cyclophosphamid die ADCC oder die Lectin-induzierte Zytotoxizität (127).
Hunnighake und Fauci (91) verzeichneten nach Zytostase mit Cyclophosphamid (300mg/kg) eine Verminderung von Monozyten und Makrophagen in Blut und Bauchhöhle, nicht aber von Alveolarmakrophagen in der Lunge. Die Funktion der genannten Zellen war negativ beeinträchtigt.
Die Applikation von 200mg/kg Cyclophosphamid konnte die antitumorale Antwort der Makrophagen verstärken, die BCG vermittelte tumorizide Aktivität wurde jedoch vermindert. Aus weiteren Versuchen wurde geschlossen, daß Cyclophosphamid über die Vernichtung von Lymphozyten, die Makrophagen aktivierende Lymphokine produzieren, zu einer verstärkten Wirkung von Makrophagen auf den Tumor führte (191).
Zur Wirkung von Cyclophosphamid auf Granulozyten und deren Funktionen sind derzeit noch keine Arbeiten bekannt.
Aus den eigenen Untersuchungen geht jedoch eine Steigerung der Phagozytoseleistung 2 Tage nach Applikation von niedrigen und besonders von hohen Dosen des Zytostatikums hervor. Der Mechanismus, der zu dieser Stimulation der Granulozyten führte, kann aber aus den gegenwärtigen Versuchen nicht erklärt werden. Einerseits könnte, bedingt durch das große Zeitintervall von 2 Tagen, eine vorübergehende Depression der Granulozytenaktivität übersehen worden sein. Andererseits könnte die Aktivität, durch Cyclophosphamid nicht behindert, sofort aufgrund des erhöhten Antigenaufkommens im Blut stimuliert worden sein.

6.4.Suppressorzellen

Der Einfluß von Cyclophosphamid auf Suppressorzellen wurde bereits in vielen Arbeiten diskutiert. Von besonderer Wichtigkeit waren sowohl die Dosierung als auch die Häufigkeit der Anwendung von Cyclophosphamid, der Zeitpunkt in Abhängigkeit der Antigenstimulation (24) und der Typ der Antigenstimulation (171).
Obwohl die Beeinflussung der Suppressorzellen bzw. der

Suppressormechanismen durch Cyclophosphamid noch nicht ganz klar und bis in alle Einzelheiten beschrieben ist, sind zwei Zellgruppen bisher besonders berücksichtigt worden: Makrophagen/Monozyten oder T-Zellen und deren Vorläufer.
Zur Erkenntnis über Suppressormakrophagen haben Bennet und die Gruppe um Mokyr am meisten beigetragen.
Suppressormakrophagen, die vorher durch BCG induziert wurden, waren schon bei mittlerer Dosis (100mg/kg) empfindlich (17). Die Suppressoraktivität konnte allerdings auch gesteigert werden, wenn Cyclophosphamid vor dem Antigen appliziert wurde. Da Cyclophosphamid selbst auch Suppressorzellen aktivieren kann (25, 192), schlossen Bennet et al. (17), daß entweder 2 verschiedene Suppressorzellen oder eine einzelne Suppressorzelle, auf die BCG und Cyclophosphamid synergistisch wirkten, aktiviert wurden.
Weitere Hinweise für die Hemmung des tumorfördernden Verhaltens von Makrophagen durch Cyclophosphamid fand die Arbeitsgruppe um Mokyr (84, 85, 233, 234, 235). Eine einmalige Cyclophosphamiddosis von 15mg/kg führte bei fortgeschrittenem Wachstum des MOPC-315 Plasmozytoms auf Balb/c-Mäusen zu einer nahezu vollständigen Regression. Sephadex-G10-adhärente Milzmakrophagen konnten als Ursache des Enhancements erkannt werden. In vitro Tests zeigten, daß diese Zellen nach Behandlung mit 4OH-Cyclophosphamid nicht nur ihre suppressive Aktivität verloren, sondern verstärkt Helferfunktion übernahmen.
In einem anderen Tumor-Modell (Balb/c-Mäuse, Meth-A Fibrosarkom) unterstrichen Elgert et al. (56) die Wirkung von niedrig dosierter Zytostase mit Cyclophosphamid auf suppressive Eigenschaften von Makrophagen. In vivo und in vitro verhinderten Makrophagen von tumortragenden Mäusen die T-Zell Blastogenese von Milzzellen aus gesunden Tieren. Cyclophosphamid hob diese Hemmung auf.
Beim Menschen wurde ebenfalls eine durch Cyclophosphamid verminderte Monozyten-vermittelte Suppression beobachtet (27).
Im eigenen Modell spielten Makrophagen in der Milz unter Tumorprogression zahlenmäßig keine Rolle. Es wäre trotzdem

möglich, daß Makrophagen in der Milz oder anderen lymphatischen Organen durch Cyclophosphamid beeinflußt wurden.
Applizierte man Cyclophosphamid in hoher zytostatischer Dosis 1-10 Tage vor Tumorinokulation, führte dies zu einem verstärkten Tumorwachstum und erhöhter Metastasenbildung (145, 228) oder sogar zur Toleranzbildung gegenüber dem Tumor. Es war keine Abwehr gegen den Tumor mehr feststellbar. Besonders stark war der Effekt, wenn zwischen Medikamentgabe und Tumorinokulation nur 1 Tag lag. In eigenen Vorversuchen konnte dies bestätigt werden. Beachtenswert war die deutliche Reduktion der Milzzellen, wobei alle betrachteten Subpopulationen gleichermaßen betroffen waren. Mit Cyclophosphamid (100-200mg/kg) vorbehandelte Milzzellen wirkten sowohl bei B-Zell-abhängigen (139) als auch bei T-Zell-abhängigen (25, 77, 192) Immunantworten in vitro suppressiv. Einerseits wird dafür eine Milzzelle mit dem Thy 1+ Phänotyp verantwortlich gemacht. Andererseits wurden Suppressorzellen weder den B- noch den T-Zellen zugeordnet (139, 192).
Wurde Mäusen und Hamstern eine hohe Dosis Cyclophosphamid appliziert, kam es, nach einer schweren Leukopenie und Depression der lymphatischen Organe, zu einem Reboundphänomen mit Splenomegalie. Während dieser Zeit konnten Thy 1-Ig-, nicht Nylonwolle adhärente Suppressorzellen aus der Milz entnommen werden, die sowohl die primäre wie die sekundäre Antikörperantwort unterdrücken konnten (55, 138). Zunächst glaubte man, daß die optimale immunostimulatorische Dosis von Cyclophosphamid (300mg/kg) B-Zellen der Milz reduzierte, wogegen sie T-Zellen bestehen ließ (221). Eine weitaus geringere Dosis (20mg/kg) verstärkte jedoch schon zelluläre Immunreaktionen, während sie die humorale Antwort nicht störte (3). Das Zytostatikum mußte aber vor dem Antigen gegeben werden, da es sonst nicht zu der gewünschten Reaktion kam.
Die Applikation von Cyclophosphamid in niederer und mittlerer Dosierung vor Transplantation der Tumorzellen führte zu einer Verstärkung der humoralen (125) oder zellulären (72, 129) Antwort, was einem direkten Effekt auf Suppressorzel-

len zugeschrieben wurde (72, 209).
Bei der im eigenen Versuch verwendeten Dosis (10mg/kg) wurden reife Zellen nicht mehr betroffen, sondern Vorläufer von Suppressorzellen (173). Die gründlichsten Untersuchungen am Tiermodell zu diesen Präsuppressorzellen machte die Arbeitsgruppe um Mokyr.
15mg/kg Cyclophosphamid verursachten dabei nur dann eine Tumorregression, wenn die Tumoren mindestens 8-14 Tage alt waren, egal ob sie tastbar waren oder nicht (84, 85). Eine frühere Applikation brachte keinen Erfolg, die Zytotoxizität in vitro war nicht erhöht. Cyclophosphamid wirkte dabei nicht zytostatisch, weil auch 4 Tage nach Therapie immer noch lebende Tumorzellen im Tier nachgewiesen werden konnten (37).
Die durch niedrig dosiertes Cyclophosphamid geheilten Tiere stießen erneute Tumorinokulate am 1., 6. und 31. Tag nach Therapie ab (152). Hier zeigt sich der Unterschied zur reinen Zytostase mit Cyclophosphamid (200mg/kg) besonders deutlich. Alle am 1., 6. und 31. Tag nach Therapie inokulierten Tumoren wuchsen, eine erneute hochdosierte Chemotherapie zeigte keinen Erfolg mehr.
In vitro Versuche mit 4OH-Cyclophosphamid bei Milzzellen von tumortragenden Tieren führten, in sehr niedriger Dosis, zu einer verstärkten Zytotoxizität gegen Tumorzellen. Die Tumorzellen selbst wurden von dieser Dosis im Wachstum nicht beeinträchtigt (152). Dies bestätigt die Ergebnisse des Splenektomieversuchs, bei dem Cyclophosphamid und gleichzeitige Splenektomie keinen Effekt auf den Tumor hatten.
Mehrere Autoren publizierten, daß der Transfer von normalen T-Zellen die Immunostimulation von Cyclophosphamid verhindern konnte (72, 177). Milzzellen gesunder Mäuse, die mit Cyclophosphamid vorbehandelt waren, entwickelten eine vierfach erhöhte mitogene Antwort auf Dextransulfat. Dies konnte durch den Zusatz von unbehandelten T-Zellen verhindert werden, nicht jedoch, wenn diese in vitro mit 4OH-Cyclophosphamid inkubiert wurden (51).
Zwei Populationen von Milzzellen waren gegenüber 4OH-Cyclo-

phosphamid in vitro unterschiedlich empfindlich. Jene, die verantwortlich für die Vermittlung einer spezifischen zellulären Reaktion gegen Schaferythrozyten gemacht wurde, war sensibel für 3µg/ml, die zweite, die spezifische Suppressorzellen enthielt, war schon für 1µg/ml empfindlich (103).

Die in vitro Zytotoxizität von Milzzellen gegen allogene Tumorzellen wurde durch 4OOH-Cyclophosphamid moduliert (45). Die Vorbehandlung der Milzzellen mit 15µM 4OOH-Cyclophosphamid verhinderte die Entwicklung von Suppressorzellen in der Kultur. Die empfindlichen Präsuppressorzellen waren Lyt 1+2+ und die reifen Suppressorzellen Lyt1-2+.

Ozer et al. (165) beschrieben die in vitro Beeinflussung von menschlichen Lymphozyten. 4OH-Cyclophosphamid inhibierte in sehr niederer Konzentration die Entwicklung von ConA induzierten Suppressorzellen. Die Dosis lag 1000-fach unter der, die für eine direkte Wirkung auf Lymphozyten durch DNS-Alkylierung nötig war. Reife zytotoxische Lymphozyten waren dagegen resistent gegen das Zytostatikum in hoher Konzentration. Es scheint, daß mit niederer Dosis ein Reifungsprozeß von Prä- zu reifen Suppressorzellen unterbunden wurde.

Man muß diese in vitro Versuche kritisch betrachten. Die Autoren verwendeten nur einen Metaboliten. Diesem setzten sie Zellen zwar eine definierte Zeit aus und testeten danach Zellfunktionen. Vom Cyclophosphamid ist aber bekannt, daß es eine erhebliche Anzahl von Stoffwechselprodukten gibt, die alkylierend wirken können. Es sind auch höchst toxische Metaboliten wie z.B. Akrolein bekannt. Des weiteren dauert der Stoffwechsel von Cyclophosphamid teilweise mehrere Stunden bzw. es werden aktive Metaboliten, vorübergehend inaktiviert, in Geweben abgelagert. Aus diesem Grund können diese in vitro Beobachtungen nicht immer ohne weiteres mit in vivo Ergebnissen verglichen werden.

Aufgrund der bisher in der Literatur beschriebenen Effekte von Cyclophosphamid in niedriger Dosierung dürfte in unserem Modell die Wirkung auf Präsuppressorzellen angenommen werden. Dies sind nach Germain und Benacerraf (69) Lympho-

zyten mit dem Lyt 1 Phänotyp. Durch die fehlende Reifung dieser Zellen kann der Abfall der Lyt 2.1+ Suppressorzellen erklärt werden. Dieser Effekt war allerdings nur temporär, sodaß es wenige Tage später wieder zum Auftreten von Suppressorzellen kam, die das Tumorwachstum erneut förderten. Eine Bestätigung für diese Annahme war die Verlängerung des Tumorwachstumsstillstandes nach einer zweiten Gabe von Cyclophosphamid in einem weiteren Versuch.

7. Möglichkeiten der Wechselwirkung von Cyclophosphamid mit dem Tumornekrosefaktor (TNF)

In den letzten Jahren fand der TNF starke Beachtung. Es handelt sich um ein Makromolekül, das in vitro nach "priming" mit BCG (155) und anschließender Gabe von LPS oder in vivo nach Applikation von LPS (39) unter Tumorwachstum von aktivierten Monozyten oder Makrophagen freigesetzt wird (155).
Dieser Faktor führt zur Nekrose von Tumoren, aber nicht unbedingt zur Tumorabstoßung (20, 39). Andererseits fördert er die Freisetzung von Interleukin I, GM-CSF, Kollagenase und PGE2. Er steigert außerdem die Phagozytose, die Zytotoxizität und die Adhärenz von Granulozyten (155) und Makrophagen (169). Berendt et al. (20) konnten zeigen, daß die Wirkung T-Zell abhängig war, weil eine tödliche Bestrahlung oder eine Thymektomie mit Bestrahlung keinen Effekt des TNF zuließen. Zudem kam es nach erfolgter Tumorregression zu langdauernder Immunität gegen diesen Tumor, die durch Transfer von T-Lymphozyten auf normale Tiere übertragbar war.
Der TNF führt aber durch Freisetzung von PGE2 aus Monozyten auch zu seiner eigenen Unterdrückung im Sinne einer negativen Rückkopplung. Chun et al. (39) durchbrachen diese Kette, indem sie unter Tumorwachstum 1 Tag nach LPS Indomethazin verabreichten. Das Auftreten von Nekrosen und Abstoßung des Tumors stieg daraufhin auf das doppelte an. Eine weitere Steigerung erfolgte nach zusätzlicher Applika-

tion von Cyclophosphamid (30mg/kg) einen Tag nach Indomethazin. Mit einer Therapie bestehend aus OK 432, einem Immunmodulator, Cyclophosphamid und LPS wurden gute Erfolge bei C57bl-Mäusen mit LL-Tumoren erzielt (3).
In unserem System könnte der TNF durch Applikation von Cyclophosphamid (10mg/kg) und daraus resultierender Beseitigung von T-Suppressorzellen in seiner Aktivität verstärkt worden sein.
Die Wirkung könnte damit nicht nur direkt tumorizid sein, sondern auch indirekt über die Aktivierung von Phagozyten oder deren Vermehrung erfolgen. Ein Indiz wäre die Steigerung der Phagozytoseaktivität nach Therapie.

8.Klinischer Ausblick

Im vorliegenden Versuch konnte eine funktionelle Splenektomie durchgeführt werden. Darunter versteht man eine Veränderung der Funktion der Milz, die in der Wirkung einer echten Splenektomie gleichkommt. Der apparative Aufwand war, im Vergleich zu einem früheren Experiment, diesen Effekt durch Bestrahlung der Milz zu erreichen (57), gering.
Ausgangspunkt dieser Arbeit war eine Studie über die therapeutische Wirkung der Splenektomie bei Magenkarzinompatienten (188). Sie hatte ergeben, daß eine Gastrektomie verbunden mit einer Splenektomie der alleinigen Gastrektomie in Bezug auf die Überlebenszeit unabhängig vom Tumorstadium immer überlegen war. Es traten jedoch schwere Nebenwirkungen wie z.B. subphrenischer Abszeß, Peritonitis, Sepsis, Anastomoseninsuffizienz und Pneumonie bei den splenektomierten Patienten deutlich häufiger auf. Die Letalität des Eingriffs lag bei 4,6% gegenüber 0% bei der Gastrektomie allein.
Eine funktionelle Splenektomie, wie im Versuch durchgeführt, könnte den geringeren chirurgischen Aufwand mit weniger Nebenwirkungen und die Vorteile einer Splenektomie kombinieren.

Bast et al. (12) konnten zeigen, daß OKT 8+ Suppressorzellen im Blut von Karzinompatienten nach Applikation von niedrig dosiertem Cyclophosphamid (200mg/m^2) bereits signifikant reduziert wurden, während OKT 4+ Helferzellen erst bei der dreifachen Dosis betroffen waren.
In ersten Funktionstests bei Malignompatienten, die mit niedrig dosiertem Cyclophosphamid behandelt wurden, erwies sich eine Dosis von 300mg/m^2 einer solchen von 1000mg/m^2 überlegen (18). Die Hautreaktion gegen KLH war zwar bei beiden Gruppen signifikant, die Antikörperproduktion aber nur bei den Patienten mit der niedrigen Dosis erhöht.
Die Typ IV Allergie gegen autologe Tumorzellen war bei Melanompatienten, die mit niedriger Dosis Cyclophosphamid vorbehandelt wurden, stärker ausgeprägt. 2 von 8 Patienten entwickelten nach zweimaliger solcher Behandlung eine gesteigerte antitumorale Antwort, Melanommetastasen in Haut, Lunge und Leber bildeten sich zurück. Die Patienten waren 24 bzw. 33 Monate nach Therapie tumorfrei!
Diese Befunde zeigen, daß eine niedrig dosierte "Zytostase" mit Cyclophosphamid auch bei sonst hoffnungslosen Krankheitsstadien zur Besserung und Heilung führen kann.
Eine derartige Anwendung von Cyclophosphamid stellt aber nur eine Möglichkeit dar, Suppressorvorgänge unter Tumorwachstum zu unterbrechen.
Aufgrund der Ergebnisse - Wachstumshemmung des Tumors durch Milzzellpopulationsverschiebung - sollte der Einsatz weiterer Immunmodulatoren wie z.B. LPS oder deren Kombination zunächst noch im Tierversuch geprüft werden.
Es bleibt weiterhin das Ziel, Malignome möglichst effektiv und ohne große chirurgische Eingriffe, wie sie die Splenektomie darstellt, durch eine Stärkung der körpereigenen Abwehr zu bekämpfen.

F. Zusammenfassung

Am Modell der LL-Tumor tragenden NMRI-Maus wurde gezeigt, daß die Feinnadelaspirationszytologie die Beobachtung von Veränderungen der Milzzellsubpopulationen unter Tumorwachstum und Cyclophosphamidtherapie erlaubt.
Es wurden weibliche NMRI-Mäuse, zu Versuchsbeginn 3 Monate alt, in Gruppen zu je 10 Tieren und LL-Tumoren verwendet. Für die FNAB wurden die Milzen der Tiere 3 Wochen vor Versuchsbeginn subcutan verlagert und fixiert. 14 Tage nach Tumorinokulation erhielten die Tiere als Therapie entweder Cyclophosphamid in einer Dosis von 10 bzw. 250mg/kg oder die Kontrolle nur isotone Kochsalzlösung.
Die aspirierten Milzzellen wurden mit hämatologischen Färbemethoden (May-Grünwald-, Giemsa-Lösung) und den fluoresceingekoppelten Antikörpern anti-Thy 1.2 (Gesamt-T-Zellen), anti-Lyt 2.1 (Suppressor-/Zytotoxische T-Zellen) und anti IgG (B-Zellen) markiert und anschließend unter dem Mikroskop differenziert. Außerdem wurde mit einem Teil der Milzzellen ein Phagozytosetest mit opsonierten Cymosanpartikeln durchgeführt.
Um den rein zytostatischen Effekt auf die Tumorzellen von dem immunmodulatorischen auf die Milzzellen abzugrenzen, wurden bei 4 Gruppen mit je 10 NMRI-Mäusen (♀, 3Monate alt) LL-Tumoren gesetzt. Die beiden Kontrollgruppen erhielten am 14. Tag 0,5ml physiol. Kochsalzlösung, die beiden Therapiegruppen 10mg/kg Cyclophosphamid. Die Tiere von je 1 Kontroll- und Therapiegruppe wurden am 14. Tag scheinoperiert, die anderen splenektomiert. Das Tumorwachstum und die Überlebenszeiten wurden registriert.
Ein Transferversuch (Winn Assay) sollte die zytotoxische Wirkung von vorbehandelten Milzzellen zeigen. Tumorzellen aus 20 Mäusen wurden mit Milzzellen von je 14 gesunden, tumortragenden oder tumortragenden und mit Cyclophosphamid (10mg/kg) behandelten Spendertieren in vitro inkubiert und anschließend auf je 10 gesunde Mäuse gespritzt. Das Tumorwachstum und die Überlebenszeit wurden gemessen.

Die Ergebnisse können folgendermaßen kurz zusammengefaßt werden:

a)Hoch dosiertes Cyclophosphamid (250mg/kg) führte zu
- einer Tumorregression bei 80% der Mäuse
- einer Verminderung aller berücksichtigten weißen Milzzellpopulationen auf 10%

b)Niedrig dosiertes Cyclophosphamid (10mg/kg) bewirkte
- einen Tumorwachstumsstop von 6 Tagen
- eine signifikante Reduzierung von IgG+ und Lyt 2.1+ Milzzellen
- bei mehrmaliger Anwendung eine Verlängerung dieses Effekts
- keinen kurativen Erfolg

c)Der Splenektomieversuch bewies, daß Cyclophosphamid in niedriger Dosis nur über den Einfluß der Milz auf den Tumor hemmend wirken kann

d)Im Winn Assay führten allein die Milzzellen von Cyclophosphamid-vorbehandelten Mäusen zur Tumorregression

G.Bisher veröffentlichte Teilaspekte vorliegender Arbeit

Lersch C., Reuter M., Hammer C., Brendel W.
Splenic fine needle aspiration cytology (sfnac) in Lewis Lung (LL-) tumor bearing mice after low dose Cyclophosphamide (Cy)
Transplant. Proc. (im Druck)

Lersch C., Reuter M., Hammer C., Brendel W.
Hemmung der Suppressor B- und T-Zellen durch niedrig dosiertes Cyclophosphamid in Tumorträgern
Klinische Wochenschrift (im Druck)

Reuter M., Lersch C., Hammer C., Brendel W.
Cyclophosphamidtherapie statt Splenektomie in Tumorträgern
Chirurgisches Forum 1987, 237-240, Springer, Berlin, Heidelberg, 1987

H.Literaturverzeichnis

1. Abe S., Takahashi M., Yamazaki M., Mizuno D.
Complete regression of LL-carcinoma by Cyclophosphamide in combination with immunomodulators
Jpn. J. Can. Res. (Gann) 76, 626-630, 1985

2. Abeyounis C.J., Bekierkunst A., Milgrom F.
Effect of immuniziation of Cy treatment on growth of EL-4 leukemia cells in syngeneic C57bl/6 mice
Immunological Investigations 14(6), 479-484, 1985

3. Askenase P.W., Hayden B.J., Gershon R.K.
Augmentation of delayed-type-hypersensitivity by doses of Cyclophosphamide which do not affect antibody responses
J. Exp. Med., Vol. 141, 697-702, 1975

4. ASTA Onkologika
Endoxan, Zytostatikum
ASTA-Werke, Degussa Pharma Gruppe, 1983

5. Attallah A.M., Urritia-Shaw A., Khalit R.Y., Steinberg A.D.
Interferon immunoregulation of antibody response in normal and autoimmune mice is mediated by suppressor T-cell subsets
Int. Arch. Allergy Appl. Imm. 64(3), 353-358, 1981

6. Badarocco G., Greco C., Starace G.
Cell proliferation kinetics of the intramusculary implanted LL carcinoma
Tumori 66, 669-675, 1980

7. Baggiolini M.
Phagocyte activation and its modulation by drugs
Handbook of Inflammation Vol. 5: The pharmacology of inflammation
Bionta I.L., Bray M.A., Parnham M.J., editors
Elsevier Science Publ. B.V. 1985

8. Bagley C.M., Jr., Bostick F.W., Devita V.T., Jr.
Clinical pharmacology of Cyclophosphamide
Cancer Res. 33, 226-233, 1973

9. Balducci L., Hardy C.
Concentration of hematopoetic precursors in LL carcinoma bearing mice
Exp. Hematol. 10, 104, 1982

10. Balducci L., Hardy C.
High proliferation of granulocyte-macrophage progenitors in tumor-bearing mice
Cancer Res. 43, 4643-4647, 1983

11. Balow J.E., Parrilo J.E., Fauci A.S.
Characterisation of direct effects of Cyclophosphamide on cell-mediated immunological responses
Immunology 32, 899-904, 1977

12. Bast R.C., Reinherz E.L., Maver C., Lavin P., Schlossman S.F.
Contrasting effects of Cyclophsphamide and Prednisolon on the phenotype of human peripheral blood leukocytes
Clin. Imm. Immunopath. 28, 101-114, 1983

13. Bear H.D.
Tumor-specific suppressor T-cells which inhibit the in vitro generation of cytolytic T-cells from immune and early tumor-bearing host spleens
Cancer Res. 46, 1805-1812, 1986

14. Begemann H.
Praktische Hämatologie
Thieme Verlag, 1982

15. Begemann H.
Klinische Hämatologie
Thieme Verlag, 1986

16. Bellelli L., Sezzi M.L., Tirabassi A., Ippoliti F.
Immunogenicity of LL carcinoma in C57bl/6 mice.
I.Tumor associated antigen(s) in peripheral blood, thymus and spleen of tumor bearing mice
Tumori 68, 373-380, 1982

17. Bennet J.A., Mitchell M.S.
Induction of suppressor cells by intravenous administration of Bacillus Calmette-Guerin and its modulation by Cyclophosphamide
Biochemical Pharmacology, Vol.28, 1947-1952, 1979

18. Berd D., Mastrangelo M.J.
Effect of low dose Cyclophosphamide on the immune system of cancer patients: reductionof T-suppressor function without depletion of CD8+ subset
Cancer Res. 47, 3317-3321, 1987

19. Berendt M.J., North R.J.
T-cell-mediated suppression of anti-tumor immunity
An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor
J. Exp. Med., Vol.151, 69-80, 1980

20. Berendt M.J., North R.J., Kirstein D.P.
The immunological basis of endotoxin-induced tumor regression, requirement for T-cell mediated immunity
J. Exp. Med., Vol.148, 1550-1559, 1978

21. Berman J.E., Zolla-Pazner S.
Changes in splenic histology and cytology in mice bearing plasmocytomas
Cell. Immunol. 87, 137-146, 1984

22. Bettmann R., Degwert J., Heuer J., Kölsch E.
An evaluation of the existance of soluble suppressor factors in cloned antigen-specific T-suppressor lymphocytes
Immunobiology, Vol.174, 339-346, 1987

23. Boehringer, Mannheim
Methods of Bioluminescence Analysis: Chemiluminescence
Boehringer, Mannheim, o.J., o.A.

24. Bovbjerg D.H., Ader R., Cohen N.
Long-lasting enhancement of delayed-type-hypersensitivity response to heterologous erythrocytes in mice after a single injection of Cyclophsphamide
Clin. Exp. Immunol. 66, 539-550, 1986

25. Braciale V.L., Parish C.R.
Inhibition of in vitro antibody synthesis by Cyclophosphamide-induced suppressor cells
Cell. Immunol. 51, 1-12, 1980

26. Bradner W.T., Pindell M.H.
Strain specifity of stimulated regression of sarcoma 180
Cancer Res. 25, 859-864, 1965

27. Braun D.P., Harris J.E.
Effects of combination chemotherapy on immunoregulatory cells in peripheral blood of solid tumor patients: correlation with rebound overshoot immune function recovery
Clin. Immunol. Immunopath. 20, 193-214, 1981

28. Brent L., Horsburgh T., Wood P.J.
Induction of suppressor cells and allograft tolerance
Transplant. Proc., Vol 12, No. 3, 464-472, 1980

29. Brüda B.E.
Über die Beziehungen der Milz zum Tumorwachstum
MMW 76, 1671-1672, 1929

30. Budzynski W.
LL carcinoma in mice as an experimental therapy model
I.The growth kinetics and the effect of tumor on host
Arch. Immunologiae et Therapiae Experimentalis 30, 363-372, 1982

31. Burrows P.D., Gershon R.K., Lawton A.R.
Regulation of delayed-type-hypersensitivity (DTH) in B-cell deprived mice
Fed. Proc. 35, 861, 1976

32. Cantor H., Boyse E.A.
Functional subclasses of T-lymphocytes bearing different Ly-antigens, I, II
J. Exp. Med., Vol.141, 1376-1401, 1975

33. Carnaud C., Hoch B., Trainin N.
Influence of immunologic competence of the host on metastases induced by the 3LL Lewis tumor in mice
JNCI, Vol.152, 395-399, 1974

34. Carnaud C., Ilfeld D., Brook I., Trainin N.
Increased reactivity of mouse spleen cells sensitized in vitro against syngeneic tumor cells in the presence of a thymic humoral factor
JNCI, Vol.138, 1521-1532, 1973

35. Carnaud C., Markowicz O., Trainin N.
The influence of a graft versus host reaction on the incidence of metastases after tumor transplantation
Cell. Immunol. 14, 87-97, 1974

36. Chang R.W., Turk J.L.
Increased resistance in splenectomized mice to a methylchloranthrene-induced tumor
Br. J. Cancer 35, 768-776, 1977

37. Chassoux D.M., Gotch F.M., Maclennan I.C.M.
Analysisof synergy between Cyclophosphamide therapy andimmunity against a mouse tumor
Br. J. Cancer 38, 211-218, 1978

38. Chiorazzi N., Fox D.A., Katz D.H.
Hapten-specific IgE antibody responses in mice
VI.Selective enhancement of IgE antibody production by low doses of X-irradiation and by Cyclophosphamide
J. Immunol. 117, 1629-1637, 1976

39. Chun M., Hoffmann M.K.
Combination immunotherapy of cancer in a mouse model: synergism between TNF and other defence systems
Cancer Res. 47, 115-118, 1987

40. Chun M., Hoffmann M.K.
Modulation of interferon-induced Nk-cells by Il II and cAMP
Lymphokine Res. 1, 91, 1982

41. Chun M., Krim M., Granelli-Piperno A., Hirst A., Hoffmann M.K.
Enhancement of cytotoxic activity of natural killer cells by interleukin II, and antagonism between interleukin II and adenosine cyclic monophosphate
Scand. J. Immunol. 22, 375-381, 1985

42. Ciutis de A., Polley M., Metakis L., Peterson C.
Immunologic defect of the alternative pathway of complement-activation post splenectomy: a possible relation between splenectomy and infection
J. Natl. Med. Ass. 70, 667-669, 1978

43. Colnaghi M.I., Menard S.
Regulatory role of T-suppressor cells on natural and induced humoral anti-tumor reactivity of C57bl/6J mice
J. Immunol., Vol.124, 2530-2535, 1980

44. Constantopoulos A., Najjar V., Wish J., Necheles T., Stolbach L.
Defective phagocytosis due to tuftsin deficiency in splenectomized subjects
Am. J. Dis. Child 125, 663-665, 1973

45. Cowens J.W., Ozer H., Ehrke M.J., Greco W.R., Colvin M., Mihich E.
Inhibition of the development of suppressor cells in culture by 4OH-Cyclophosphamide
J. Immunol., Vol.132, No.1, 95-100, 1984

46. Cox P.J., Phillips B.J., Thomas P.
The encymatic basis of selective action of Cyclophosphamide
Cancer Res. 35, 3755-3761, 1975

47. Datta S.K., Gallagher J.J., Trentin J.
Natural cell-mediated cytotoxicity in hamster
Int. J. Cancer 23, 728-734, 1979

48. DeWys W.D.
A quantitative model for the study of the growth and treatment of a tumor and its metastases with correlation between proliferative state and sensitivity to Cyclophosphamide
Cancer Res. 32, 367-373, 1972

49. DeWys W.D.
Studies correlating the growth rate of a tumor and its metastases and providing evidence for tumor-related systemic growth-retarding factors
Cancer Res. 32, 374-379, 1972

50. DeWys W.D., Mansky J.M.
Delayed hematological recovery after Cyclophosphamide treatment in the presence of an advanced tumor
Cancer Res. 33, 2662-2667, 1973

51. Diamantstein T., Willinger E., Reiman J.
T-suppressor cells sensitive to Cyclophosphamide and to its in vitro active derivate 4OH-Cyclophosphamide control the mitogenic response of murine splenic B-cells to dextran sulfate. A direct proof for different sensitivities of lymphocyte subsets to Cyclophosphamide
J. Exp. Med., Vol.150, 1571-1576, 1979

52. Doll J.N., Wilson M.R., Salvaggio J.F.
Inhibition of pmn leukocyte chemiluminescence for detection of immune complexes in human sera
J. Clin. Invest. 66, 457-464, 1980

53. Domeyer B.E., Sladek N.E.
Kinetics of Cyclophosphamide biotransformation in vivo
Cancer Res. 40, 174-180, 1980

54. Drossler K., Parker D., Turk J.L.
The effect of Cyclophosphamide on immunological memory
Immunopharmacology 6, 123-132, 1983

55. Duthu A., Le Goffic N., Loisillier F., de Vaux Saint-Cyr C.
Cyclophosphamide induction of splenic suppressor cells in hamsters
Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 132C, 185-202, 1980

56. Elgert K.D., Foo A.S., Burger C.J., Farrar W.L.
Conversion of normal host splenocytes to suppressor cells by tumor-induced suppressor T-cell-derived factor: Cyclophosphamide treatment reverses inhibitory activity
J. Biol. Response Mod. 2(3), 238-250, 1983

57. Enker W.E., Jacobitz Y.L.
In vivo splenic irradiation eradicates suppressor T-cells causing the regression and inhibition of established tumors
Int. J. Cancer 25, 819-825, 1980

58. Evans R.
Combination therapy by using Cyclophosphamide and tumor-sensitized lymphocytes: a possible mechanism of action
J. Immunol., Vol.130, 2511-2513, 1983

59. Evans R.
Phenotypes associated with tumor rejection mediated by Cyclophosphamide and syngeneic tumor-sensitized T lymphocytes: potential mechanisms of action
Int. J. Cancer 33, 381-388, 1984

60. Ferrer J.F., Mihich E.
Effect of splenectomy on the regression of transplantable tumors
Cancer Res. 28, 1116-1120, 1968

61. Fray A., Thobie N., Liacopoulos P.
Enhancement of LL carcinoma growth by sera or spleen cells from tumor-bearing mice
Ann. Immunol. (Inst. Pasteur), 289-298, 1982

62. Friedrich A., Walther E., Bomski B., Glass W.
Simultane Untersuchungen der Granulozytenphagozytose, Serumimmunglobuline, akute Phase-Proteine und der dritten Komplementkomponente bei Patienten mit malignen Tumoren
Arch. Geschwulstforschung 54, 137-152, 1984

63. Frost P., Prete P., Kerbel R.
Abrogation of the in vitro generation of the cytotoxic T-cell response to a murine tumor: the role of suppressor cells
Int. J. Cancer 30, 211-217, 1982

64. Fujimoto S., Greene M., Sehon A.H.
Regulation of the immune response to tumor antigens
I.Immunosuppressor cells in tumor-bearing hosts
J. Immunol., Vol.116, 791-799, 1976

65. Fujimoto S., Greene M., Sehon A.H.
Regulation of the immune response to tumor antigens
II.The nature of immunosuppressor cells in tumor-bearing hosts
J. Immunol., Vol.116, 800-806, 1976

66. Fujimoto S., Matsuzawa T., Nakagawa K., Tada T.
Cellular interaction between cytotoxic and suppressor T-cells against syngeneic tumors in the mouse
Cell. Immunol. 38, 378-387, 1978

67. Furusawa E., Furusawa S.
Adverse effect of Cyclophosphamide at moderate dose in combination with standard drugs on intraperitoneally implanted LL carcinoma in mice
Chemotherapy 31, 216-222, 1985

68. Garnis S., Lala P.K.
Surface markers of small lymphocytes appearing in the mouse Ehrlich ascites tumor, host, spleen and blood
Immunol. 34, 487-499, 1978

69. Germain R.N., Benacerraf B.
Hypothesis: A single major pathway of T-lymphocyte interactions in antigen specific immunosuppression
Scand. J. Immunol. 13, 1-10, 1981

70. Gershon R.K., Carter R.L.
Mechanism by which the spleen may act in regulating tumor immunity after tumor resection
JNCI 43, 545-551, 1969

71. Giraldi T., Sava G., Cuman R., Nisi C., Lassiani L.
Selectivity of the antimetastatic and cytotoxic effects of 1-p-(3,3-dimethyl-1-triazeno)benzoic acid potassium salt, (+)-1,2-di(3,5-dioxopiperazin-1-yl) propane and Cyclophosphamide in mice bearing LL carcinoma
Cancer Res. 41, 2524-2528, 1981

72. Glaser M.
Augmentation of specific immune response against a syngeneic SV40-induced sarcoma in mice by depletion of suppressor T-cells with Cyclophosphamide
Cell. Immunol. 48, 339-345, 1979

73. Glaser M.
Indomethazin-sensitive suppressor cells regulate the cell-mediated cytotoxic response to SV40-induced tumor-associated antigens in mice
Eur. J. Immunol. 10, 489-495, 1980

74. Greenberg P.D., Kern D.E., Cheever M.A.
Therapy of disseminated murine leukemia with Cyclophosphamide and immune Lyt 1+2- T cells
J. Exp. Med., Vol.161, 1122-1134, 1985

75. Greenberg P.D.
Therapy of murine leukemia with Cyclophosphamide and immune Lyt 2+ cells: cytolytic T cells can mediate eradication of disseminated leukemia
J. Immunol., Vol.136, 1917-1922, 1986

76. Greene M.I., Perry L.L., Benacerraf B.
Regulation of the immune response to tumor antigens V.Modulation of suppressor T-cell activity in vivo
Am. J. Pathol. 95, 159-170, 1979

77. Hancock E.J., Kilburn D.G.
The effect of Cyclophosphamide on in vitro cytotoxic responses to a syngeneic tumor
Cancer Immunol. Immunother. 14, 54-58, 1982

78. Hankansson L., Venge P.
Kinetic studies of neutrophil phagocytosis. V.Studies on the cooperation between the Fc and C3b receptors
Immunol. 47, 687-694, 1982

79. Hansbrough J., Peterson V., Zapata-Sirvent R., Claman H.N.
Postburn immunosuppression in an animal model II.Restoration of cell-mediated immunity by immunomodulating drugs
Surgery, Vol.95, No.3, 290-295, 1984

80. Hardt C., Röllinghoff M., Pfizenmaier K., Mosmann H., Wagner H.
Lyt 2.3+ Cyclophosphamide-sensitive T cells regulate the activity of an interleukin II inhibitor in vivo
J. Exp. Med., Vol.154, 262-274, 1981

81. Haskill S., Parthenais E.
Immunologic factors influencing the intratumor localisation of ADCC effector cells
J. Immunol., Vol.120, 1813-1817, 1978

82. Havas H.F., Schiffman G.
Effect of Cyclophosphamide on the immune response of Balb/c mice bearing an IgM plasmocytoma (TEPC-183)
Cancer Res. 41, 801-807, 1981

83. Heckner F.
Praktikum der mikroskopischen Hämatologie, 5.Aufl, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore 1981

84. Hengst J.C.D., Mokyr M.B., Dray S.
Cooperation between Cyclophosphamide tumoricidal activity and host antitumor immunity in the cure of mice bearing large MOPC-315 tumors
Cancer Res. 41, 2163-2167, 1981

85. Hengst J.C.D., Mokyr M.B., Dray S.
Importance of timing in Cyclophosphamide therapy of MOPC-315 tumor-bearing mice
Cancer Res. 40, 2135-2141, 1980

86. Herrath E. v.
Bau und Funktion der normalen Milz, S 44
Walter De Gruyter & Co, Berlin 1958

87. Hoepke H.
Die antiblastische Wirkung der Milz von Walker-Tumor-Ratten
Zschr. Krebsforsch. 58, 378-424, 1952

88. Holland J.F., Frei E. III.
Cancer Medicine
2.Aufl., S 824-826, Lea & Febiger, Philadelphia 1982

89. Hollander N., Isakov N., Segal S., Feldman M.
An immunoregulatory factor associated with spleen cells from tumor bearing animals
II.Characterisation of the cell populations involved in its production and release
Int. J. Cancer 22, 471-478, 1978

90. Hoon D.S.B., Ramshaw I.A.
Chemotherapeutic effect of Cyclophosphamide on the highly metastatic MAT 13762 tumor
Cancer Immunol. Immunother. 20, 175-178, 1985

91. Hunninghake W., Fauci A.S.
Immunological reactivity of the lung. IV.Effect of Cyclophosphamide on alveolar macrophage cytotoxic effect or function
Clin. Exp. Immunol. 27, 555-559, 1977

92. Ilfeld D., Carnaud C., Cohen I.R., Trainin N.
In vitro cytotoxicity and in vivo tumor enhancement induced by mouse spleen cells autosensitized in vitro
Int. J. Cancer 12, 213-222, 1973

93. Imamura M., Fujimoto H., Fukuhara T., Kobayashi M., Kasai M., Sakurada K.
Characterisation studies of suppressor cells in murine bone marrow chimeras
Immunol. 60, 29-36, 1987

94. Isakov N., Hollander N., Segal S., Feldman M.
An immunoregulatory factor associated with spleen cells from tumor-bearing animals.
III.Characterisation of the factor's target cells
Int. J. Cancer 23, 410-414, 1979

95. Isakov N., Segal S., Hollander N., Feldman M.
An immunoregulatory factor associated with spleen cells from tumor-bearing animals
I.Effect on tumor growth and antibody production
Int. J. Cancer 22, 465-470, 1978

96. Ishibashi Y., Yamashita T.
Effects of a phagocytosis-stimulating factor derived from polymorphonuclear neutrophils on the functions of macrophages
Infection and Immunity, 1762-1766, 1987

97. Jakobisiak M.
Influence of classic immunosuppressants on spleen colony formation in mice. 3.Concentration of colony forming units in bone marrow and spleens of Cyclophosphamide-treated mice
Arch. Immunologiae et Therapiae Experimentalis 27, 517-521, 1979

98. Jessup J.M., Le Grue S.J., Kahan B.D., Pellis N.R.
Induction of suppressor cells by a tumor-derived suppressor factor
Cell. Immunol. 93, 9-25, 1985

99. Kadhim S.A., Rees R.C.
Enhancement of tumor growth in mice: evidence for the involvement of host macrophages
Cell. Immunol. 87, 259-269, 1984

100. Kaliss N.
Dynamics of immunologic enhancement
Transplant. Proc. 2, 59-67, 1970

101. Kaliss N., Molmut N.
Effect of prior injections of tissue antiserums on the survival of cancer homoiografts in mice
Cancer Res. 12, 110-112, 1952

102. Katz S.I., Parker D., Turk J.L.
B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions
Nature, Vol.251, 550-551, 1974

103. Kaufmann S.H.E., Hah H., Diamantstein T.
Relative susceptibilities of T cell subsets involved in delayed-type hypersensitivity to sheep red blood cells to the in vitro action of 4OOH-Cyclophosphamide
J. Immunol. 125, 1104-1108, 1980

104. Kerckhaert J.A., Hofhuis F.M., Willers J.M.
Effects of variation in time and dose of Cyclophosphamide injection on delayed hypersensitivity and antibody formation
Cell. Immunol. 117, 1629-1637, 1976

105. Kitagawa S., Ohta M., Nojiri H., Kakinuma K., Saito M., Takaku F., Miura Y.
Functional maturation of membrane potential changes and superoxide-producing capacity during differentiation of human granulocytes
J. Clin. Invest. 73, 1062-1071, 1984

106. Klostergaard J., Danlap B., Lisafeld B.A., Klein E., Holtermann O.A.
Enhancement of granulocyte phagocytosis by products of PPD stimulated human lymphocytes
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharm. 16, 171-174, 1977

107. Klostergaard J., Lisafeld B.A., Danlap B., Klein E., Holtermann O.A.
Activation of neutrophilic granulocytes by products of human lymphocytes
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 57, 542-548, 1978

108. Kolb J-P.B., Poupon M-F.M., Lespinats G.M., Sabolovic D., Loisillier F.
Splenic modifications induced by Cyclophosphamide in C3H/He, nude and B-mice
J. Immunol., Vol.118, 1595-1599, 1977

109. Koppi T.A., Halliday W.J.
Cellular origin of blocking factors from cultured spleen cells of tumor bearing mice
Cell. Immunol. 76, 29-38, 1983

110. Kunzo O., Konage E., Okada T., Kunisada K., Yumura M., Tanaka S.
Effect of splenectomy in tumor bearing mice and gastric cancer patients
Gann 68, 731-736, 1977

111. Kupper T.S., Green D.R., Chaudry I.H., Fox A., Baue A.
A Cyclophosphamide-sensitive suppressor T cell circuit induced by thermal injury
Surgery, Vol.95, No.6, 699-705, 1984

112. Kurata T., Micksche M.
Correlation of immune response with clinical stage in LL tumor-bearing mice
Oncology 35, 155-159, 1974

113. Lagrange P.H., Mackaness G.B., Miller T.E.
Potentiation of T cell mediated immunity by selective suppression of antibody formation with Cyclophosphamide
J. Exp. Med. 139, 1529-1539, 1974

114. Laing C.A.
Kinetics of the reactivity of subpopulations of spleen cells of mice bearing virus-induced mammary tumors to syngeneic antigenic extracts in vitro
Cancer Immunol. Immunother. 13, 98-104, 1982

115. Lala P.K., McKenzie F.C.
An analysis of T lymphocyte subsets in tumor-transplanted mice on the basis of Lyt antigenic markers and functions
Immunol. 47, 663-677, 1982

116. Lee M.Y., Rosse C.
Depletion of lymphocyte subpopulations in primary and secondary lymphoid organs of mice by a transplanted granulocytosis inducing mammary carcinoma
Cancer Res. 42, 1255-1260, 1982

117. Lersch C., Ganghof O., Feifel G., Hammer C., Meyer J.
Hat die Milz Einfluß auf das Tumorwachstum
Chirurgisches Forum 1982

118. Lersch C., Hammer C., Thiel M., Brendel W.,
Fine needle aspiration cytology of the spleen of tumor bearing mice
J. Immunolog. Meth. 66, 307-312, 1984

119. Lersch C., Hammer C., Thiel M., Brendel W.
Fluktuationen von immunkompetenten Zellen in Mäusemilzen unter Tumorwachstum - in vivo monitoring durch Feinnadelaspirationszytologie
Chirurgisches Forum 1984, 265-267, Springer, Berlin, Heidelberg 1984

120. Lersch C., Hammer C., Thiel M., Lenz P., Brendel W.
Analysis of tumor-enhancing lymphocytes in murine spleens removed at different time intervals after 3LL-tumor inoculation
J. Exp. Clin. Cancer Res. 5, 2, 1986

121. Lersch C., Meyer J., Hammer C., Brendel W.
Influence of asplenia and splenectomy on tumor growth in mice
J. Exp. Clin. Cancer Res. 1, 111-116, 1982

122. Lersch C., Thiel M., Hammer C., Krombach F., Brendel W.
Serial evaluation of absolute spleen cell numbers in LL tumor-bearing mice
Cancer Invest. 3(6), 535-539, 1985

123. Lersch C., Thiel M., Hammer C., Schunke M., Krombach F., Brendel W.
Splenic fine needle aspiration cytology in small animals with transplanted tumors
Transplant. Proc., Vol.17, No.5, 2132-2133, 1985

124. Likehite V.
Immunological impairment and susceptibility to infection after splenectomy
JAMA 236, 1376-1377, 1976

125. Livingston P.O., DeLeo A.B., Jones M.
Comparison of approaches for augmenting the serologic response to the individually specific methylchloranthren-induced sarcoma-Metha A: pretreatment with Cyclophosphamide is most effective
J. Immunol. 131, 2601-2605, 1983

126. Llende M., Santiago-Delpin E.A., Lavergne J.
Immunobiological consequences of splenectomy: a review
J. Surg. Res. 40, 85-94, 1986

127. Lopez D.M., Paul R.D., Gadgil A.U., Lichter W.
Functionally sensitive and resistant populations of lymphoid cells from normal and mammary tumor bearing mice following treatment with Cyclophosphamide
Anticancer Res. 2, 227-234, 1982

128. Loven D., Lurie H., Hazan G.
Enhanced effect of systemic Cyclophosphamide by local tumor hyperthermia on mice
Cancer Treatment Rep., Vol.70, No.4, 509-512, 1986

129. Maguire H.
Increased tumor immunity with Cyclophosphamide
Proc. Am. Ass. Cancer Res. 18, 185, 1977

130. Maguire H. Jr., Farris L.W.
Cyclophosphamide intensifies the aquisition of allergic contact dermatitis in mice rendered B-cell deficient by heterologous anti IgM antisera
Immunol. 37, 367-372, 1979

131. Manor Y., Treves A.J., Cohen I.R., Feldman M.
Transition from T cell protection to T cell enhancement during tumor growth in an allogenic host
Transplant., Vol.22, No.4, 360-366, 1976

132. Mantovani A.
Effects of in vitro tumor growth of murine macrophages isolated from sarcoma lines differing in immunogenicity and metastasizing capacity
Int. J. Cancer 741-746, 1978

133. Mantovani A., Lunini W., Peri G.
Effect of agents on natural cell mediated cytotoxicity in mice
JNCI 61, 1255-1261, 1978

134. Mastrangelo M.J., Berd D., Maguire H.
The immunoaugmenting effects of cancer chemotherapeutic agents
Seminars in Oncology, Vol.13, No.2, 186-194, 1986

135. Matheisz J.S., Allen J.C.
Fatigue of human pmn leukocyte function associates with bacterial ingestion
Clin. Immunol. Immunopath. 12, 125-131, 1979

136. Mattern J., Wauss K., Volm M.
Optimum time sequenze for the administration of Cyclophosphamide and other drugs in vivo
Anticancer Res. 5, 173-178, 1985

137. Mayo J.G.
Biologic characterization of the subcutaneously implanted LL tumor
Cancer Chemotherapy Reports Part 2, Vol.3, No.1, 325-330, 1972

138. McIntosh K.R., Segre M., Segre S.
Characterization of Cyclophosphamide-induced suppressor cells
Immunopharmacology 4, 279-289, 1982

139. McIntosh K.R., Segre M., Segre S.
Inhibition of the humoral response by spleen cells from Cyclophosphamide treated mice
Immunopharmacology 1, 165-173, 1979

140. Melby K., Midtvedt T., Degre M.
Effect of human leukocyte interferon on phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes
Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B, 90, 181-184, 1982

141. Merluzzi V.J., Faanes R.B., Choi Y.S.
Restoration of Cyclophosphamide-induced suppression of thymus-derived cytotoxic cell generation by normal thymocytes
Cancer Res. 39, 3647-3654, 1979

142. Merluzzi V.J., Kenney R.E., Schmid F.A., Choi Y.S., Faanes R.B.
Recovery of the in vivo cytotoxic T-cell response in Cyclophosphamide-treated mice by injection of mixed-lymphocyte-culture supernatants
Cancer Res. 41, 3663-3665, 1981

143. Merluzzi V.J., Walker M.M., Faanes R.B.
Inhibition of cytotoxic T-cell clonal expansion by Cyclophosphamide and the recovery of cytotoxic T-lymphocyte precursors by supernatants from mixed-lymphocyte-cultures
Cancer Res. 41, 850-853, 1981

144. Merluzzi V.J., Welte K., Savage D.M., Last-Barney K., Mertelsmann R.
Expansion of Cyclophosphamide-resistant cytotoxic precursors in vitro and in vivo by purified human interleukin II
J. Immunol., Vol.131, 806-809, 1983

145. Milas L., Malenica B., Allegretti N.
Enhancement of artificial lung metastases in mice caused by Cyclophosphamide
Cancer Immunol. Immunother. 6, 191-196, 1979

146. Milas L., Mujagic H.
The effect of splenectomy on fibrosarcoma metastases in lungs in mice
Int. J. Cancer 11, 186-190, 1973

147. Milton J.D., Carpenter C.B., Addison I.E.
Depressed T-cell reactivity and suppressor activity of lymphoid cells from Cyclophosphamide-treated mice
Cell. Immunol. 24, 308-317, 1976

148. Möller E.
Interaction between tumor and host during progressive neoplastic growth in histoincompatible recipients
JNCI 35, 1053-1059, 1965

149. Mokyr M.B., Braun D.P., Usher D., Reiter H., Dray S.
The development of in vitro and in vivo anti-tumor cytotoxicity in noncytotoxic, MOPC-315-tumor-bearer, spleen cells educated in vitro with MOPC-315 tumor cells
Cancer Immunol. Immunother. 4, 143-150, 1978

150. Mokyr M.B., Colvin M., Dray S.
Cyclophosphamide-mediated enhancement of antitumor immune potential of immunosuppressed spleen cells from mice bearing a large MOPC-315 tumor
Int. J. Immunopharmacol., Vol.7, No.1, 111-112, 1985

151. Mokyr M.B., Dray S.
Cyclophosphamide-mediated selective elimination of suppressor activity from spleen of mice bearing a large MOPC-315 tumor
Proc. Am. Ass. Cancer Res. 24, 204, 1983

152. Mokyr M.B., Dray S.
Some advantages of curing mice bearing a large subcutaneous MOPC-315 tumor with a low rather than a high dose of Cyclophosphamide
Cancer Res. 43, 3112-3119, 1983

153. Mokyr M.B., Hengst J.D.C., Dray S.
Role of antitumor immunity in Cyclophosphamide-induced rejection of subcutaneous nonpalpable MOPC-315 tumors
Cancer Res. 42, 974-979, 1982

154. Mule J.J., Stanton T.H., Hellström I., Hellström K.E.
Suppressor pathways in tumor immunity: a requirement for Qa-1 positive tumor bearer spleen T cells in suppression of the afferent immune response to tumor antigens
Int. J. Cancer 28, 353-359, 1981

155. Munker R., Koeffler H.P.
Tumor necrosis factor: recent advances
Klin. Wochenschrift, 1987, im Druck

156. Nagel J.E., Han K., Coon P.J., Adler W.H., Bender B.S.
Age differences in phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes measured by flow cytometry
J. Leukocyte Biology 39, 399-407, 1987

157. Nanishi F., Nomoto K., Taniguchi K., Kubo C.
Analysis of the mechanism of allograft rejection and cell-mediated immunity: I.Accelerated rejection of tumor allografts without augmented cytotoxitity in the spleen cells
Immunol. 40, 67-76, 1980

158. Nelson M., Nelson D.S., McKenzie I.F.C., Blanden R.V.
Thy and Ly markers on lymphocytes initiating tumor rejection
Cell. Immunol. 60, 34-42, 1981

159. Nordlund J., Gershon R.K.
Splenic regulation of the clinical appearance of small tumors
J. Immunol. 114, 1486-1490, 1975

160. North R.J.
Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells
J. Exp. Med., Vol.55, 1063-1074, 1982

161. Nouza K., Nemec M., Dräber P.
The influence of host splenectomy on the tumor allograft promoting effectiveness of antilymphocyte serum
Folia Biologica 19, 267-272, 1973

162. Nowrousian M.R., Schmidt C.G.
Comparative effects of ASTA 7557 (INN mafosfamide) and Cyclophosphamide on hematopoesis in mice
Invest. New Drugs 2, 207-213, 1984

163. Otu A.A., Russel R.J., Wilkinson P.C.
Alterations of mononuclear phagocyte function induced by LL carcinoma in C57bl mice
Br. J. Cancer 36, 330-340, 1977

164. Ozawa H., Iwaguchi T., Kataoka T.
The Lyt phenotype of the T cells responsible for in vivo tumor rejection in syngeneic mice
Cancer Immunol. Immunother. 23, 73-77, 1986

165. Ozer H., Cowens J.W., Colvin M., Nussbaum-Blumenson A., Sheedy D.
In vitro effects of 4OH-Cyclophosphamide on human immunoregulatory T-subset function
J. Exp. Med., Vol.155, 276-290, 1982

166. Pabst R.
Die Milz, ein überflüssiges Organ?
Med. Klinik 8, 210-216, 1981

167. Pelus L.M., Bockman R.S.
Increased prostaglandin synthesis by macrophages from tumor-bearing mice
J. Immunol., Vol.123, 2118-2125, 1979

168. Peppoloni S., Mathieson B., Herberman R.B., Overton R.W. Gorelik E.
In vivo resistance of secondary antitumor immune response to Cyclophosphamide: effects on T cell subsets
Cancer Immunol. Immunother. 24, 48-56, 1987

169. Philip R., Epstein L.B.
Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, interferon and interleukin I
Nature, Vol.323, No.83, 86-89, 1986

170. Porcellini A., Manna A., Talevi N., Sparaventi G., Marchetti-Rossi M-T., Baronciani D., de Biagi N.
Effects of two Cyclophosphamide derivates on hemopoietic progenitor cells and pluripotental stem cells
Exp. Hematol. 12, 863-866, 1984

171. Quian J-H., Kokudo S., Sato S., Hamaoka T., Fujiwara H.
Tolerance induction of alloreactivity by portal venous inoculation with allogeneic cells followed by the injection of Cyclophosphamide: I.Specific suppression of alloreactive cytotoxic and delayed-type hypersensitivity responses as well as allograft rejection
Transplantation, Vol.43, No.4, 538-543, 1987

172. Raff M.C.
Surface antigenic markers for distinguishing T- and B-lymphocytes in mice
Transpl. Rev. 6, 52-80, 1971

173. Rao V.S., Bennet, J.A., Shen F.W.
Antigen-antibody complexes generate Lyt-1 inducers of suppressor cells
J. Immunol. 125, 63-67, 1980

174. Riccardi C., Barlozziari T., Sntoni A., Herberman R.B., Cesarini C.
Transfer to Cy-treated mice of natural killer (NK) cells and in vivo natural reactivity against tumors
J. Immunol., Vol.126, No.4, 1284-1289, 1981

175. Ritter C., Ruthman R.J., Goldstein N.O.
Modulation of cellular toxicity of nitrogen mustard in murine cells
Cancer Res. 47, 472-476, 1987

176. Roberts R., Gallin J.I.
The phagocytic cell and its disorders
Ann. of Allergy, Vol.50, No.9, 330-345, 1983

177. Röllinghoff M., Starzinski-Powitz, Pfizenmaier K., Wagner H.
Cyclophosphamide-sensitive T lymphocytes suppress the in vitro generation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes
J. Exp. Med., Vol.145, 455-459, 1977

178. Ron Y., Gorelik E., Feldman M., Segal S.
Effect of splenectomy on the progression of postoperative pulmonary metastases of 3LL tumor
Eur. J. Cancer Clin. Oncol., Vol.18, No.4, 391-397, 1982

179. Roos D., Bot A., van Schaik M., de Boer M., Daha M.R.
Interaction between human neutrophils and zymosan particles: the role of opsonins and divalent cations
J. Immunol., Vol.126, 433-440, 1981

180. Rosenstein M., Eberlein T.J., Rosenberg S.A.
Adoptive immunotherapy of established syngeneic solid tumors: role of T lymphoid subpopulations
J. Immunol., Vol.132, 2117-2122, 1984

181. Rumi L., Pasqualini C.D., Rabasa S.L.
Growth of sarcoma 180 in splenectomized mice bearing diffusion chambers containing spleen or tumor cells
Europ. J. Cancer 7, 551-555, 1971

182. Saal J.G., Hadam M., Frank F., Rautenstrauch H., Fritz P.
Effect of ASTA-Z-7557 (INN mafosfamid) a precursor of 4OH-Cyclophosphamid on human T-lymphocytes' Fc-receptor and immuno-regulatory functions
Invest. New Drugs 2, 231-235, 1984

183. Sachs L.
Angewandte Statistik
Springer Verlag, 1983

184. Santer V., Mastrmarino J., Lala P.K.
Characterization of lymphocyte subsets in spontaneous mammary tumors and lymphoid organs
Int. J. Cancer 25, 159-168, 1980

185. Schatten S., Granstein R.D., Debrin J.A., Greene M.I.
Suppressor T cells and the immune response to tumors
CRC Crit. Rev. Immunol. 4(4), 335-379, 1984

186. Schechter B., Segal S., Feldman M.
Enhancing lymphocytes in spleens of tumor-bearing mice: affinity chromatography on insolubilized histamine
Int. J. Cancer 20, 239-246, 1977

187. Schechter B., Segal S., Feldman M.
Generation of suppressor lymphocytes during sensitization in culture against a syngeneic tumor: affinity chromatography on insolubilized histamine
J. Immunol., Vol.120, 1268-1273, 1978

188. Schreiner J.
Der Einfluß der Splenektomie auf die immunkompetenten Zellen im peripheren Blut von Magenkarzinom Patienten
Dissertation, München, 1986

189. Schunke M., Lersch C., Hammer C., Brendel W.
Der Einfluß der Splenektomie auf das Tumorwachstum bei T-Zellen-defizienten Mäusen
Chirurgisches Forum 1986, 121-123, Springer, Berlin Heidelberg, 1986

190. Schultz R.M., Chirigos M.A.
Effects of irradiation and Cyclophosphamide treatments on expression of macrophage tumoricidal function in mice
Proc. Am. Ass. Cancer Res. 19, 15, 1978

191. Schultz R.M., Pavlidis N.A., Chirigos M.A., Weiss J.F.
Effects of whole body X-irradiation and Cyclophosphamide treatment on induction of macrophage tumoricidal function in mice
Cell. Immunol. 38, 302-308, 1978

192. Segre M., Tomei E., Segre D.
Cyclophosphamide-induced suppressor cells in mice: suppression of the antibody response in vitro and characterization of the effector cells
Cell. Immunol. 91, 443-454, 1985

193. Shalaby M.R., Assisi F.C., Aggarwal B., Svedersky L.P., Palldino M.A.
Activation of human polymorphonuclear neutrophils by lymphokines
Fed. Proc. 43, 1924, 1984

194. Shand F.L., Howard J.G.
Induction in vitro of reversible immunosuppression and inhibition of B cell receptor regeneration by defined metabolites of Cyclophosphamide
Eur. J. Immunol. 9, 17-21, 1979

195. Shibita Y., Shibuya E., Ishida N.
Relationships between suppressor macrophages and macrophage precursors in the spleens from tumor-bearing mice
Cell. Immunol. 85, 45-57, 1987

196. Shibita Y., Volkman A.
The effect of bone marrow depletion on prostaglandin E producing suppressor macrophages in mouse spleen
J. Immunol. Vol.135, 3897-3904, 1985

197. Shiku H.
Expression of T-cell differentiation antigens on effector cells in cell mediated cytotoxicity in vitro: Evidence for functional heterogenecity related to surface phenotype of T-cells
J. Exp. Med., Vol.141, 227-239, 1975

198. Siegel R.E.
Galen's system of physiology and medicine
Verlag S. Karger, Basel, New-York, 1968

199. Small M.
Characteristics of the immature cells involved in T cell-mediated enhancement of syngeneic tumor growth
J. Immunol., Vol.118, 1517-1523, 1977

200. Small M., Trainin N.
Separation of populations of sensitized lymphoid cells into fractions inhibiting and fractions enhancing syngeneic tumor growth in vivo
J. Immunol., Vol.117, 292-297, 1976

201. Smith K.A., Begg A.C., Denekamp J.
Differences in chemosensitivity between subcutaneous and pulmonary tumors
Eur. J. Cancer Clin. Oncol., Vol.21, No.2, 249-256, 1985

2o2. Spirer Z.
The role of spleen in immunity and infection
Advanc. in Pediatr. 20, 55-80, 1980

203. Spitznagel J.K., Shafer W.M.
Neutrophil killing of bacteria by oxygen-independent mechanisms: a historical summary
Rev. of Infect. Diseases, Vol.7, No.3, 398-403, 1985

204. Starkebaum G., Jimenenz R.A.H., Arend W.P.
Effect of immune complexes on human neutrophil phagocytic function
J. Immunol. 128, 141-147, 1982

205. Stites D.P., Stobo J.D., Fudenberg H.H., Wells J.V.
Basic & Clinical Immunology
4.Aufl., Lange Medical Publications, 1982, S 119, S 285

206. Stockman G.D., Heim L.R., South M.S.
Differential effects of Cy on the B and T cell compartments of adult mice
J. Immunol., Vol.110, 277-282, 1973

207. Struck R.F., Alberts D.S.
Blood levels of alkylating metabolites of Cyclophosphamide in the mouse after i.v. or oral administration
Cancer Treatm. Rep., Vol.68, No.5, 765-770, 1984

208. Sugiura K., Stock C.
Studies in tumor spectrum
Cancer 5, 382-402, 1952

209. Sy M-S., Miller S.D., Claman H.N.
Immune suppression with supraoptimal doses of antigen in contact sensitivity. I.Demonstration of suppressor cells and their sensitivity to Cyclophosphamide
J. Immunol., Vol.119, 240-244, 1977

210. Talha M.R.Z., Rogers H.J., Trounce J.R.
Distribution and pharmacokinetics of Cyclophosphamide in the rat
Br. J. Cancer 41, 140-143, 1980

211. Taniguchi M., Tada T.
Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. IV.Effects of various immunosuppressive drugs
J. Immunol., Vol.107, 579-585, 1971

212. Thiel M.
Interaktionen zwischen dem Lewis Lung Tumorwachstum und Milzzellsubpopulationen
Dissertation, München, 1987, im Druck

213. Thiel M., Lersch C., Hammer C., Krombach F., Schödel F., Lenz P., Brendel W.
Chemiluminescenz und Morphologie von Milzzellen in Mäusen unter Tumorwachstum
Chirurgisches Forum 1985, 85-88, Springer, Berlin, Heidelberg 1985

214. Ting C.C., Hargrove M.E., Stephany D.
Generation of activated killer cells in tumor-bearing hosts
Int. J. Cancer 39, 232-239, 1987

215. Ting C.C., Hargrove M.E.
Tumor cell-triggered macrophage-mediated suppression of the T-cell cytotoxic response to tumor-associated antigens. II.Mechanisms for induction of suppression
JNCI 69(4), 873-878, 1982

216. Tischendorf F.
On the evolution of the spleen
Experientia 41, 145-152, 1985

217. Treves A.J., Carnaud C., Trainin N., Feldman M., Cohen I.R.
Enhancing T lymphocytes from tumor-bearing mice suppress host resistance to a syngeneic tumor
Eur. J. Immunol. 4, 722-727, 1974

218. Treves A.J., Cohen I.R., Feldman M.
A syngeneic metastatic tumor model in mice: the natural immune response of the host and its manipulation
Israel. J. Med. Science, Vol.12, No.4-5, 369-382, 1976

219. Treves A.J., Cohen I.R., Feldman M.
Suppressor factor secreted by T-lymphocytes from tumor-bearing mice
JNCI, Vol.57, No.2, 409-414, 1976

220. Tsuru S., Aiso S., Taniguchi M., Zinnaka Y., Nomoto K.
Mechanism of in vivo generation of cytotoxic T lymphocyte activity against syngeneic tumors. I.Local differentiation of mature cytotoxic T lymphocytes in the rejection of tumors
Immunol. 54, 281-288, 1985

221. Turk J.L., Poulter L.W.
Selective depletion of lymphoid tissue by Cyclophosphamide
Clin. Exp. Immunol. 10, 185-196, 1972

222. Tyler J.D., Galli S.J., Snider M.E., Dvorak A.M., Steigmuller D.
Cloned Lyt 2+ cytolytic T-lymphocytes destroy allogeneic tissue in vivo
J. Exp. Med., Vol.159, 234-243, 1984

223. Umiel T., Trainin N.
Immunological enhancement of tumor growth by syngeneic thymus-derived lymphocytes
Transplantation, Vol.18, No.3, 244-250, 1974

224. Urban J.L., Shepard M., Rothstein J.L., Sugarman B.J., Schreiber H.
Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.83, 5233-5237, 1986

225. Usul M., Aokl I., Sunshine G.H., Dorf M.E.
A role for macrophages in suppressor cell induction
J. Immunol., Vol.132, 1728-1734, 1984

226. Varkila K., Hurme M.
The effect of Cyclophosphamide on cytotoxic T-lymphocyte responses: inhibition of helper T-cell induction in vitro
Immunology 48, 433-438, 1983

227. Vidovic D., Marusic M., Culo F.
Interference of anti-tumor and immunosuppressive effects of Cyclophosphamide in tumor-bearing rats: analysis of factors determining resistance or susceptibility to a subsequent tumor challenge
Cancer Immunol. Immunother. 14, 36-40, 1982

228. Vollmer T.L., Conley F.K.
Effect of Cyclophosphamide on survival of mice and incidence of metastatic tumor following intravenous and intracardial inoculation of tumor cells
Cancer Res. 44, 3902-3906, 1984

229. Weinberg S.R., Gruber D.F., Dubois E., Ledney G.D.
Modulations in mouse hemopoiesis after engraftment with 3LL carcinoma cells
Expl. Cell. Biol. 53, 252-259, 1985

230. Weir D.M.
Handbook of experimental immunology, vol.2, cellular immunology, chapter 32
3/Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinb., Melbourne, 1978

231. Winn H.J.
The immune response and the homograft reaction
Nat. Cancer Inst. Monogr. 2, 113, 1959

232. Yamagishi H., Oka T., Hashimoto I., Pellis N.R., Kahan B.D.
The role of spleen in tumor bearing host, I., II.
Jpn. J. Surgery 14, 61-77, 1984

233. Ye Q-W., Mokyr M.B.
Cyclophosphamide-induced appearance of immunopotentiating T-cells in the spleens of mice bearing a large MOPC-315 tumor
Cancer Res. 44, 3873-3879, 1984

234. Ye Q-W., Mokyr M.B., Dray S.
The suppression of antitumor immunity by macrophages in the spleens of mice bearing a large MOPC-315 tumor
Federation Proc. 42, 1190, 1983

235. Ye Q-W., Mokyr M.B., Pyle J.M., Dray S.
Suppression of antitumor immunity by macrophages in spleens of mice bearing a large MOPC-315 tumor
Cancer Immunol. Immunother. 16, 162-169, 1984

236. Yoshioka T., Fujiwara H., Takai Y., Ogata M., Shimizu J., Hamaoka T.
The role of tumor-specific Lyt 1+2- T cells in eradicating tumor cells in vivo: II.Lyt 1+2- T cells have potential to reject antigenically irrelevant (bystander) tumor cells on activation with the specific target tumor cells
Cancer Immunol. Immunother. 24, 8-12, 1987

237. Young M.R., Henderson S.
Enhancement in immunity of tumor bearing mice by immunization against prostaglandin E2
Immunological Communications 11(5), 345-356, 1982

238. Young M.R., Hoover C.S.
Inhibition of spleen cell cytotoxic capacity toward tumor by elevated prostaglandin E2 levels in mice bearing LL carcinoma
JNCI, Vol.77, No.2, 425, 1986

239. Young M.R., Knies S.
Prostaglandin E production by LL carcinoma: mechanism for tumor establishment in vivo
JNCI, Vol.72, No.4, 919-922, 1984

240. Young M.R., Newby M., Wepsic H.T.
Hematopoesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic LL carcinoma tumors
Cancer Res. 47, 100-105, 1987

241. Young M.R., Sundharads G., Cantarow W.D., Kumar P.R.
Purification and functional characterisation of a low molecular weight immune modulating factor produced by LL carcinoma
Int. J. Cancer 30, 517-524, 1982

242. Yu S., Lannin D.R., Tsui-Collins A.L., McKhann C.F.
Effect of Cyclophosphamide on mice bearing methyl-chloranthren-induced fibrosarcomas
Cancer Res. 40, 2756-2761, 1980

Anhang

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr.med. Dr.h.c. W. Brendel, der mich in sein Institut aufgenommen und für die wissenschaftliche Arbeit begeistert hat.

Herrn Prof. Dr.med. Dr.med.vet. C. Hammer für das Dissertationsthema und die konstruktive Kritik meiner Arbeit.

Herrn Dr.med. C. Lersch, der sich mit Rat und Tat außergewöhnlich eingesetzt hat. Sein Beitrag hat die Arbeit entscheidend beeinflußt.

Frau C. Czapo und Frau G. Höbel für die Herstellung der Abbildungen.

Herrn O. Frisch, stellvertretend für alle Tierpfleger.

Lebenslauf

19.12.1960	geboren in Ulm Eltern: Günter Reuter, Ingenieur Gerda Reuter, geb. Grün
1967 - 1971	Besuch der Grundschule in Neu-Ulm Ludwigsfeld
1971 - 1980	Besuch des Gymnasium Neu-Ulm, naturwissenschaftlicher Zweig
1980	Abitur
1980 - 1981	Wehrdienst in Manching, Würzburg, München und Landsberg
1981 - 1987	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians Universität München
Herbst 1984	Beginn der Doktorarbeit
1986 - 1987	Praktisches Jahr, Klinikum Großhadern Chirurgie, Prof. Heberer Innere Medizin, Prof. Wilmanns Orthopädie, Prof. Wirth
3.6.1987	Approbation als Arzt
seit Februar 1988	Assistenzarzt in der Chirurgie, Gesamthochschule Essen